



RECEIVED

MAR -1 2002

TECH CENTER 1600/2900

GENE CODING FOR RECOMBINANT HEAT-RESISTANT MALTOSE PHOSPHORYLASE, RECOMBINANT VECTOR CONTAINING THE SAME GENE, TRANSFORMANT CONTAINING THE SAME VECTOR AND ITS PRODUCT

Patent Number: JP10262683
Publication date: 1998-10-06
Inventor(s): INOUE YASUSHI; TOMITA TETSUJI; ISHII KEIKO; OOSHIMA YOSHIE; YAMANE KUNIO
Applicant(s): SHOWA SANGYO CO LTD
Requested Patent: JP10262683
Application Number: JP19970109996 19970325
Priority Number(s):
IPC Classification: C12N15/09 ; C07H21/04 ; C12N1/21 ; C12N9/12 ; C12P19/02 ; C12P19/12
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new gene for production of an enzyme, comprising a gene having a specific base sequence and coding for a heat-resistant maltose phosphorylase phosphorylizing maltose and capable of providing trehalose which is an agent for preventing drying of a protein.

SOLUTION: This new gene comprises DNA composed of a base sequence represented by base numbers 182-2455 in a base sequence described in the formula or DNA hybridizing the DNA under stringent conditions and coding for recombinant heat-resistant maltose phosphorylase having the following enzymatic properties: The maltose phosphorylase reversibly phosphorylates maltose and has nearly 60-70 deg.C optimum temperature and exhibits about $\geq 50\%$ maximum activity in the range of 50-70 deg.C and has $\geq 80\%$ activity after treating it at 80 deg.C for 15 min in 10 mM acetic acid buffer solution (pH 6.0) and has 6.0-7.0 optimum pH, 150,000-190,000 molecular weight (by gel permeation method) and 4.7-5.1 isoelectric point and is useful for inexpensive production, etc., of trehalose for protecting drying of protein, etc.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-262683

(43) 公開日 平成10年(1998)10月6日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

F I

C 1 2 N 15/09

Z N A

C 1 2 N 15/00

Z N A A

C 0 7 H 21/04

B

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 1/21

9/12

9/12

C 1 2 P 19/02

C 1 2 P 19/02

審査請求 未請求 請求項の数12 書面 (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願平9-109996

(22) 出願日

平成9年(1997)3月25日

(71) 出願人 000187079

昭和産業株式会社

東京都千代田区内神田2丁目2番1号

(72) 発明者 井上 靖

千葉県船橋市日の出2-20-2 昭和産業
株式会社総合研究所内

(72) 発明者 富田 哲司

千葉県船橋市日の出2-20-2 昭和産業
株式会社総合研究所内

(72) 発明者 石井 圭子

千葉県船橋市日の出2-20-2 昭和産業
株式会社総合研究所内

(74) 代理人 弁理士 長沼 要

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組換え耐熱性マルトースホスホリラーゼをコードする 遺伝子、該遺伝子を含む組換えベクター
及び該ベクターを含む形質転換体とその産生物

(57) 【要約】

【課題】 組換え耐熱性マルトースホスホリラーゼをコードする遺伝子、該遺伝子を含む組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体、該形質転換体を培養して組換え耐熱性マルトースホスホリラーゼを製造する方法、及び該酵素の利用法を提供すること。

【解決手段】 以下の(a)又は(b)のDNAからなる遺伝子。

(a) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列の内、塩基番号182~2455で表される塩基配列からなるDNA。

(b) 塩基配列(a)からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ組換え耐熱性マルトースホスホリラーゼをコードするDNA。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)又は(b)のDNAからなる遺伝子。

(a) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列の内、塩基番号182~2455で表される塩基配列からなるDNA。

(b) 塩基配列(a)からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ下記の酵素化学的性質を有する組換え耐熱性マルトースホスホリラーゼをコードするDNA。

(1) 作用

マルトースを可逆的に加リン酸分解する。すなわち、リン酸存在下でマルトースに作用させると、等モルのグルコースと β -グルコース-1-リン酸を生成し、グルコースとグルコース-1-リン酸に作用させると等モルのマルトースとリン酸を生成する。

(2) 基質特異性

マルトースに特異的に作用する。

(3) 至適温度

マルトース加リン酸分解反応の至適温度は60℃~70℃付近で、50℃~70℃の範囲で最高活性の約50%以上を示す。

(4) 熱安定性

10mM酢酸緩衝液(pH6.0)中で、60℃、15分間処理後80%以上の活性を有する。

(5) 至適pH

6.0~7.0。

(6) pH安定性

pH5.5~8.0で安定。

(7) 失活

100℃、10分間の加熱で100%失活する。

(8) 分子量

ゲル濾過クロマトグラフィーにより測定した値は15万~19万。

(9) 等電点

4.7~5.1。

(10) 阻害剤

HgCl₂で著しく活性が阻害される。

【請求項2】 配列表の配列番号1に記載の塩基配列の内、塩基番号182~2455で表される塩基配列からなるDNAが好熱性バチルス属細菌由来のものである請求項1記載の遺伝子。

【請求項3】 好熱性バチルス属細菌由来のものがバチルスsp. RK-1 (FERM P-15044)である請求項1又は請求項2に記載の遺伝子。

【請求項4】 請求項1、2又は3に記載の遺伝子を含む組換えベクター。

【請求項5】 遺伝子がバチルスsp. RK-1 (FERM P-15044)の染色体由来の2,655塩基対のDNA断片である請求項4記載の組換えベクター。

【請求項6】 遺伝子がバチルスsp. RK-1 (FERM P-15044)の耐熱性マルトースホスホリラーゼをコードする遺伝子部分である2,274塩基対のDNA断片である請求項4記載の組換えベクター。

【請求項7】 ベクターがプラスミドベクターpRMP1由来のものである請求項4、5又は6記載の組換えベクター。

【請求項8】 請求項4、5、6又は7に記載の組換えベクターを含む形質転換体。

【請求項9】 形質転換体が大腸菌である請求項8記載の形質転換体。

【請求項10】 請求項8又は請求項9に記載の組換え形質転換体を培養して、組換え耐熱性マルトースホスホリラーゼを製造する方法。

【請求項11】 請求項10に記載の組換え耐熱性マルトースホスホリラーゼ及び耐熱性トレハロースホスホリラーゼの存在下に、マルトースとリン酸もしくはリン酸塩とを、水性媒体中で、反応させることを特徴とするトレハロース又は β -グルコース-1-リン酸の製造方法。

【請求項12】 請求項11の反応が55~70℃、pH4.5~8.0で行われる請求項11記載のトレハロース又は β -グルコース-1-リン酸の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、耐熱性マルトースホスホリラーゼをコードする遺伝子、該遺伝子を含む組換えベクターとその形質転換体、該形質転換体を用いた組換え耐熱性マルトースホスホリラーゼの製造方法、及び該組換え耐熱性マルトースホスホリラーゼを用いたトレハロース又は β -グルコース-1-リン酸の製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】トレハロースは、酵母、かび、細菌、昆虫等に広く分布する二糖類で、他の二糖類に比べて安定なことから蛋白質等の乾燥保護剤(特表昭63-500562)としての利用等が考えられている有用な糖質である。

【0003】従来、トレハロースを調製する方法としては、酵母からの抽出法(特開平5-292986)、細菌による発酵法(特開平5-211882)等が知られている。しかし、これらの方法で調製したトレハロースは、大量生産が操作的、設備的に困難である、不純物除去工程が複雑である等の理由から製造コストが高くなり、非常に高価であるため食品用途には利用することができなかった。

【0004】一方、安価にトレハロースを調製する有効な方法として酵素法が挙げられる。その一つとして、マルトースホスホリラーゼとトレハロースホスホリラーゼを用いた同時反応法がある(特公昭63-6099

8)。この方法は2種類のホスホリラーゼがそれぞれマルトースとトレハロースに作用して可逆的に加リン酸分解しグルコースと β -グルコース-1-リン酸を生じる反応を利用したもので、安価な原料であるマルトースに両酵素を同時に作用させるとトレハロースが生成するものである。

【0005】これまでに知られているマルトースホスホリラーゼとしては、ラクトバチルス・ブレビス (*Lactobacillus brevis*) ATCC8287 (Agr. Biol. Chem, 37 (12), 2813~2819, 1973)、ラクトバチルス・サンフランシスコ (*Lactobacillus sanfrancisco*) (特開平1-91778)、ラクトバチルス・ブレビス (*Lactobacillus brevis*) DMS20054、NCIB8836、8561、8562、ラクトバチルス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*) DMS20174、微工研菌寄第4628号、ラクトバチルス・レウテリ (*Lactobacillus reuteri*) DSM20016、ラクトバチルス・フェルメンテウム (*Lactobacillus fermentum*) DMS20052、ストレプトコッカス *spec.* (*Streptococcus spec.*) 微工研菌寄第4624号、微工研菌寄第4625号、微工研菌寄第4626号、微工研菌寄第4627号 (特公昭60-54036)、プレシオモナス (*Plasiomonas*) SH-35 (日本農芸化学会誌, 69 (臨時増刊号), 28, 1995)、プロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ (*Propionibacterium freudenreichii*) KY4002、エンテロコッカス・フェシウデンライヒ (*Enterococcus faecium*) ATCC10541 (特開平7-5984)、エンテロコッカス・ヒラエ (*Enterococcus hirae*) IFO3181 (日本農芸化学会誌, 70, 773, 1996)、ロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) ATCC12291、ラクトコッカス・ラクチス・サブエスピー・ラクチス (*Lactococcus lactis subsp. lactis*) IFO127007 (特開平8-280382)、アルスロバクター・シトレウス (*Artrobacter citreus*) ATCC11624、バチルス・サーキュランズ (*Bacillus circulans*) ATCC9966、ブレビバクテリウム・*sp.* (*Brevibacterium sp.*) AJ3125、コリネバクテリウム・ゼロシス (*Corynebacterium xerosis*) ATCC373、フラボバクテリウム・*sp.* (*Flavobacterium sp.*) AJ2469、ミクロコッカス・ルテウス (*Micrococcus luteus*) ATCC272、セラチア・*sp.* (*Serratia sp.*) AJ2478、ストレプトマイセス・フラボビレンス (*Streptomyces flavovirens*) IFO3197、キサントモナス・キャンペストリス (*Xanthomonas campestris*) AJ2784 (特開平8-280395) が生産するものが挙げられる。

【0006】これらのマルトースホスホリラーゼの内、酵素化学的に酵素の特性が調べられているものは、ラクトバチルス・ブレビス ATCC8287 (Agr. Biol. Chem, 37 (12), 2813~2819, 1973)、ラクトバチルス・サンフランシスコ (特開平1-91778)、プレシオモナス SH-35 (日本農芸化学会誌, 69 (臨時増刊号), 28, 1995)、エンテロコッカス・ヒア IFO3181 (日本農芸化学会誌, 70, 773, 1996)、プロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ KY4002 (J. FERM. BIOENG., 82, 171, 1996) である。これらの酵素の熱安定性は、高いものでも50℃以下と低く、工業的製造条件で利用するのは困難である。

【0007】一般に、工業的に酵素反応で生産を行う場合、雑菌汚染の低減の目的から反応温度は55℃以上の高温が一般的に採られている。反応温度の高温化は基質と生産物の溶解度を上げて単位体積当たりの仕込量を多くすることができ、且つ、酵素反応速度が早くなり反応時間の短縮化ができる等の利点があるので、コスト的にも有利である。このようなことから工業的に使用される酵素は、一般的には熱安定性の優れたものが選ばれる。

【0008】また、工業的に使用される酵素は、生産コストを下げるためにより安価であることも求められる。つまり、酵素生産微生物は酵素生産性が高いことを要求される。

【0009】この様な状況に鑑み、本発明者らは高温での酵素反応によるトレハロースの製造を行える高い熱安定性を有する耐熱性マルトースホスホリラーゼにつき鋭意探索したところ、好熱性バチルス属細菌が生産するマルトースホスホリラーゼが55℃以上の温度で使用しても失活しないことを見出した (特開平9-37780)。

【0010】しかしながら、これらの微生物は酵素の生産能力が十分でなく、トレハロースや β -グルコース-1-リン酸を大量に生産しようとすると、微生物を大量に培養しなければならないという問題があった。この問題を解決するためには従来は、微生物の酵素生産能を改善する煩雑な育種操作を行っていた。具体的には、野生株を紫外線、エックス線、薬品 (NTG (N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン)、EMS (エチルメタンスルホネート) 等) 等を用いた人工的変異手段で変異処理し、酵素生産性の向上した変異株を作製する

といったものである。

【0011】また、マルトースホスホリラーゼを生産する微生物はマルトースホスホリラーゼと同時に少量のマルターゼも生産する場合が多い。このため、マルトースホスホリラーゼをトレハロースホスホリラーゼと共にマルトースに作用させてトレハロースを製造する場合や、マルトースに作用させて β -グルコース-1-リン酸を製造する場合、マルトースホスホリラーゼ粗酵素中に混入しているマルターゼがマルトースを加水分解することによってトレハロースや β -グルコース-1-リン酸の収量低下が起こる。この問題を解決する方法の一つとして、粗酵素を精製してマルターゼを除くことが考えられるが、この場合は、酵素生産コストが高くなる問題が生じる。或いは、別の方法として、人工的に酵素の生産性や活性を変異させることによって、マルターゼの遺伝子の発現を抑制したり、マルトースホスホリラーゼ活性だけを上げて相対的にマルターゼ活性を抑えるなどの方法が考えられる。

【0012】そこで、本発明者らも、マルトースホスホリラーゼ活性を持つバチルス属の細菌に対して変異処理を行ったが、思惑とは異なって、マルターゼ活性と共にマルトースホスホリラーゼ活性も消失した変異株や、マルトースホスホリラーゼ活性と共にマルターゼ活性も上昇した変異株しか得ることができなかった。このことは、マルトースホスホリラーゼの遺伝子とマルターゼの遺伝子とが、何らかの関連を持って連動している可能性を示唆すると考えられた。この問題を解決するためには、偶然に頼る変異処理法ではなく、遺伝子を単離して塩基配列を解析する遺伝子工学的な方法を採用が必要であると考えられた。

【0013】一方、現在は、全アミノ酸配列が解明されていない酵素であっても、これをコードする遺伝子を単離し、その塩基配列を解明できれば、その酵素をコードするDNAを含む組換えDNAを作製し、これを微生物や動植物の細胞に導入して得られる形質転換体を培養することにより、比較的容易に所望量の酵素が取得できるようになった。

【0014】そこで、かかる状況に鑑み、上記耐熱性酵素をコードする遺伝子を突き止めてその遺伝子配列を解析すること、遺伝子を組み込んだ形質転換体により酵素の生産性や活性を改善することは重要な技術的課題である。

【0015】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、組換え耐熱性マルトースホスホリラーゼをコードする遺伝子、該遺伝子を含む組換えベクター、該組換えベクター含む形質転換体、該形質転換体を培養して組換え耐熱性マルトースホスホリラーゼを製造する方法、及び該酵素の利用法を提供することを目的とする。

【0016】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、高い熱安定性を有する耐熱性マルトースホスホリラーゼを自然界より探索した結果、目的とする新規な耐熱性マルトースホスホリラーゼを好熱性バチルス属細菌が産生することを見出し（特開平9-37780号公報）、特に茨城県の土壌から分離したバチルス *sp.* RK-1 が強い耐熱性マルトースホスホリラーゼ産生能を示したことを発見し、通産省工業技術院生命工学工業技術研究所、特許微生物寄託センターへ寄託している（FERM P-15044）。

【0017】そして、更に研究を重ねた結果、本菌株の耐熱性マルトースホスホリラーゼ遺伝子を単離し、該遺伝子から構造遺伝子を見つけ、遺伝子工学を利用して、組換え微生物を作製することによって酵素の生産性が飛躍的に上昇し、不純物の少ない、高純度の組換え耐熱性マルトースホスホリラーゼが効率よく調製できることを見出し、本発明を完成した。

【0018】次に、この組換え微生物を培養することにより、高純度の組換え耐熱性マルトースホスホリラーゼを生産させ、これを利用してトレハロースを製造することができることを見出した。

【0019】すなわち、本発明は、以下のとおりである。

【0020】1) 以下の(a)又は(b)のDNAからなる遺伝子。

【0021】(a) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列の内、塩基番号182~2455で表される塩基配列からなるDNA。

【0022】(b) 塩基配列(a)からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ下記の酵素化学的性質を有する組換え耐熱性マルトースホスホリラーゼをコードするDNA。

【0023】(1) 作用

マルトースを可逆的に加リン酸分解する。すなわち、リン酸存在下でマルトースに作用させると、等モルのグルコースと β -グルコース-1-リン酸を生成し、グルコースとグルコース-1-リン酸に作用させると等モルのマルトースとリン酸を生成する。

【0024】(2) 基質特異性

マルトースに特異的に作用する。

【0025】(3) 至適温度

マルトース加リン酸分解反応の至適温度は60℃~70℃付近で、50℃~70℃の範囲で最高活性の約50%以上を示す。

【0026】(4) 熱安定性

10mM酢酸緩衝液(pH6.0)中で、60℃、15分間処理後80%以上の活性を有する。

(5) 至適pH

6.0~7.0。

【0027】(6) pH安定性

pH5.5~8.0で安定。

【0028】(7)失活

100℃、10分間の加熱で100%失活する。

【0029】(8)分子量

ゲル濾過クロマトグラフィーにより測定した値は15万~19万。

【0030】(9)等電点

4.7~5.1。

【0031】(10)阻害剤

HgCl₂で著しく活性が阻害される。

【0032】なお、上記のDNAとして、遺伝子コードの縮重に基づき、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を変えることなく、配列表の配列番号1に示す該当する塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置き換えたものは、当然、本発明に包含される。

【0033】2) (a) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列の内、塩基番号182~2455で表される塩基配列からなるDNAが好熱性バチルス属細菌由来のものである上記1記載の遺伝子。

【0034】3) 好熱性バチルス属細菌由来のものがバチルスsp. RK-1 (FERMP-15044)である上記1又は2に記載の遺伝子。

【0035】4) 上記1、2又は3に記載の遺伝子を含む組換えベクター。

【0036】5) 遺伝子がバチルスsp. RK-1 (FERMP-15044)の染色体を制限酵素Hind IIIで切断して得た2,655塩基対のDNA断片である上記4記載の組換えベクター。

【0037】6) 遺伝子がバチルスsp. RK-1 (FERMP-15044)の耐熱性マルトースホスホリラーゼをコードする遺伝子部分である2,274塩基対のDNA断片である上記4記載の組換えベクター。

【0038】7) ベクターがプラスミドベクターpRMP1由来のものである上記4、5又は6記載の組換えベクター。

【0039】8) 上記4、5、6又は7に記載の組換えベクターを含む形質転換体。

【0040】9) 形質転換体が大腸菌である上記8記載の形質転換体。

【0041】10) 上記8又は9に記載の組換え形質転換体を培養して、組換え耐熱性マルトースホスホリラーゼを製造する方法。

【0042】11) 上記10に記載の耐熱性マルトースホスホリラーゼ及び耐熱性トレハロースホスホリラーゼの存在下に、マルトースとリン酸もしくはリン酸塩とを、水性媒体中で、反応させることを特徴とするトレハロース又はβ-グルコース-1-リン酸の製造方法。

【0043】12) 上記11の反応が55~70℃、pH4.5~8.0で行われる上記11記載のトレハロース又はβ-グルコース-1-リン酸の製造方法。

ース又はβ-グルコース-1-リン酸の製造方法。

【0044】本発明でいう「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」とは、実施例2-3に示されたサザンハイブリダイゼーションの処理条件よりも強い条件によりハイブリダイズすることを指す。具体的には、実施例2-3におけるハイブリダイズ溶液よりも構成成分の濃度が高いか、ハイブリダイゼーション温度が高いか、洗浄液の構成成分の濃度が高いか、洗浄液の温度が高いかの場合をいう。

【0045】本発明の組換え耐熱性マルトースホスホリラーゼをコードする遺伝子は、耐熱性マルトースホスホリラーゼ産生能を有する微生物から、遺伝子工学的手法により取得する。

【0046】一般に、二本鎖のDNAは、熱やアルカリの処理により水素結合が解離して一本鎖となる(変性)、また、変性したDNAは徐々に温度を下げることで、しだいにもとの二本鎖に復帰する(再生)。この変性と再生は、DNA二本鎖の塩基配列の相溶性が高いほど、変性が起こりにくく(高い温度が必要)、再生し易い。

【0047】そこで、今、異なる2種類の二本鎖DNAが試験管内に存在するとき、変性を行い、その後再生を行うことにより、異種のDNA同士は、相同的配列に依存して異種間の二本鎖を形成していく。

【0048】このような2種のDNAの間の二本鎖の会合を、ハイブリッド形成といい、この方法により異なるDNAの間の相溶性を調べることをハイブリダイゼーション法と呼んでいる。

【0049】本発明は、このようなハイブリダイゼーション法により、DNAの検索や同定等を行なうものである。

【0050】ところで、本発明のDNAは、塩基配列(a)からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするという特性を有するものである。

【0051】このことは、本発明において、ハイブリダイゼーション法により、DNAの検索や同定等を行なう場合、ストリンジェントな条件下で行なえば、耐熱性マルトースホスホリラーゼの構造遺伝子と相溶性の高いDNAはハイブリダイズするが、逆に、相溶性の低いものはハイブリダイズしないので、その結果、純度が極めて高い、該酵素由来のDNAが効率よく得ることが可能となる。

【0052】したがって、本発明は、ハイブリダイゼーション法の操作条件の設定を工夫することにより、耐熱性マルトースホスホリラーゼから、高純度の組換え耐熱性マルトースホスホリラーゼのDNAを効率よく得ることができる。

【0053】本発明のDNAが、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするという特性を有する原因については、学問的には説明していないが、多分、前記の耐

熱性マルトースホスホリラーゼの(1)～(10)の酵素化学的性質の内、特に(3)の「至適温度」及び(4)の「熱安定性」という性質から来ているものと推察される。

【0054】本発明のDNAを入手する微生物としては、バチルス属に属し、耐熱性マルトースホスホリラーゼ産生能を有する微生物であればいずれの微生物でもよい。特に、本発明者らが茨城県の土壌より分離したバチルス・sp. RK-1株(FERM P-15044)もしくはその突然変異体が好ましい。

【0055】本発明は、耐熱性マルトースホスホリラーゼをコードする遺伝子を自律複製可能なベクターに組み込んだ、複製可能な組換えベクター及び該組換えベクターを宿主に導入してなる形質転換体を包含する。

【0056】自立複製可能なベクターとしては、pBR322、Bluescript IISK(+), pUC18, pCR2.1, pLEX, pJL3, pSW1, pSE280, pSE420, pHY300PLK等のプラスミドベクターやλgt11, λZAP等のファージベクターが挙げられるが、大腸菌で発現させるには、pBR322、Bluescript IISK(+), pUC18, pKK223-3、及びpCR2.1が好適であり、枯草菌で発現させるには、pHY300PLKが好適である。

【0057】宿主としては、大腸菌、枯草菌、放線菌、酵母等が挙げられ、組換え耐熱性マルトースホスホリラーゼ生産における形質転換体の培養条件で、マルターゼを産生しないものであればよい。

【0058】また、本発明は、組換え耐熱性マルトースホスホリラーゼをコードする遺伝子を含む組換えベクターを宿主に導入してなる形質転換体を培養し、培養物から組換え耐熱性マルトースホスホリラーゼを採取してなる、組換え耐熱性マルトースホスホリラーゼの製造方法を包含する。

【0059】本発明の形質転換体の培養に用いる栄養培地としては、炭素源、窒素源、無機物、及び必要に応じ使用菌株の必要とする微量栄養素を程よく含有するものであれば、天然培地、合成培地のいずれでもよい。

【0060】炭素源としてはマルトース、スクロース、グルコース、フラクトース、デンプン、デキストリン、グリセリン等の炭化水素が用いられる。

【0061】窒素源としては、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、尿素、硝酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、グルタミン酸などのアミノ酸、尿素等の無機有機窒素化合物が用いられる。窒素源としてはペプトン、ホリペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステーパーカ、大豆粉、大豆粕、乾燥酵母、カザミノ酸、ソリュブルベジタブルプロテイン等の窒素含有天然物も使用できる。

【0062】無機物としてはリン酸二水素カリウム、リ

ン酸水素二カリウム、硫酸マグネシウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸亜鉛、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム等が用いられる。その他にビオチン、チアミン等の微量栄養素を必要に応じて使用する。

【0063】培養法としては液体培養法(振とう培養法もしくは通気攪拌培養法)がよく、工業的には通気攪拌培養法が最も適している。培養温度とpHは、使用する形質転換体の増殖に最も適した条件を選べばよい。培養時間は培養条件によって変わってくるが、通常15～48時間程度であり、組換え耐熱性マルトースホスホリラーゼの生成が確認されたとき、好ましくは生成が最大に達したときに培養を停止する。

【0064】この様にして得られた培養物から本発明の組換え耐熱性マルトースホスホリラーゼを採取するには、まず、培養液中の菌体を物理的な手法で破砕するか、有機溶剤やリゾチームのような酵素によって溶解した後、残渣を遠心分離法や濾過法等により除去する。これを限外濾過、塩析、透析、溶剤沈澱等の処理を単独或いは組み合わせに付すことにより工業用途の濃縮酵素液が調製できる。

【0065】更に、この濃縮酵素液をイオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、等電点クロマトグラフィー等の周知の単離・精製法の組合せに付すことにより、精製標品を得ることができる。

【0066】次に、本発明は、組換え耐熱性マルトースホスホリラーゼと耐熱性トレハロースホスホリラーゼの存在下にマルトースとリン酸もしくはリン酸塩とを、水溶液中で反応させることにより、トレハロース又はβ-グルコース-1-リン酸を製造する方法を包含する。

【0067】このように、本発明は、新規な好熱性バチルス属細菌、特にバチルスsp. RK-1(FERM P-15044)由来の耐熱性マルトースホスホリラーゼ遺伝子を基に、遺伝子工学的的手法により、組換え耐熱性マルトースホスホリラーゼを得、これを用いて組換え微生物を作製したものであって、これを培養すれば、酵素の生産性が飛躍的に上昇し、不純物の少ない、高純度の組換え耐熱性マルトースホスホリラーゼが調製できる点で極めて優れていると言える。

【0068】また、組換え耐熱性マルトースホスホリラーゼが工業的規模で大量に、効率よく生産できるようになった結果、これを利用することにより、有用なトレハロースの製造が飛躍的に効率よく製造することができる点においても、非常に価値がある。

【0069】以上、本発明は、本発明者らが先に見出した耐熱性マルトースホスホリラーゼについて遺伝子工学的な特性を見つけ、遺伝子工学的な手法によって、高純度でしかも耐熱性という極めて有用な特性を有する組換え耐熱性マルトースホスホリラーゼを効率よく製造できる

DNAを得た点に、格別の意義があることが分かるであろう。

【0070】以下、本発明について詳細に説明する。

【0071】[1] 耐熱性マルトースホスホリラーゼの酵素化学的性質：本発明は、本発明者らによる、耐熱性マルトースホスホリラーゼの発見に基づくものであるが、この酵素は、好熱性バチルス属細菌、バチルス・s p. RK-1株から産生されたものであり、その酵素化学的特性を調べた結果（実施例1）、その酵素化学的性質は、以下のとおりであった。

【0072】なお、マルトースホスホリラーゼ活性は、以下のよう測定した。

【0073】酵素溶液0.4mlと0.5Mリン酸クエン酸緩衝液（pH6.0）0.06ml、2W/V%マルトース0.6ml、蒸留水0.14mlを混合し、60℃、15分反応後10分間の煮沸によって反応を停止させた。次に、この反応停止液から0.02mlを採取し、グルコース検査試薬（グルコースCII-テストワ

式1 マルトース + リン酸 ⇌ グルコース + β-グルコース-1-リン酸

(2) 基質特異性

トレハロース、ネオトレハロース、マルトース、イソマルトース、セロビオース、シュクロース、p-ニトロフェノール-α-グルコシド、p-ニトロフェノール-β-グルコシドを基質として加リン酸分解反応を行ったところ、マルトース以外にはグルコースの生成がほとんど認められなかった（表1）。

【表1】

基質特異性

基 質	相対活性 (%)
マルトース	100
イソマルトース	2
トレハロース	0
ネオトレハロース	0
セロビオース	0
ゲンチオビオース	2
溶性でんぷん	2
スークロース	0
ラクトース	0
p-ニトロフェニル-α-D-グルコシド*	0
p-ニトロフェニル-β-D-グルコシド*	0

(3) 至適温度

25mMリン酸カリウム・クエン酸緩衝液（pH6.0）中で各種温度（40～85℃）で反応させたところ、マルトース加リン酸分解反応の至適温度は60℃～70℃付近で、50℃～70℃の範囲で最高活性の約5

コー；和光純薬工業（株））を3ml加え、室温で20分間反応させた後、505nmでの吸光度を分光光度計を用いて反応液中のグルコース量を測定した。遊離したグルコースの量から1分間に1μmolのマルトースを加リン酸分解した酵素量を1単位とした。

【0074】また、ホスホリラーゼであることを確認するために、陰イオン交換カラムを分離手段として示差屈折計を検出手段とする高速液体クロマトグラフィーにより、反応終了後の反応液に存在するβ-グルコース-1-リン酸を定量した。

【0075】(1) 作用

以下の式1で示すように、マルトースを可逆的に加リン酸分解する。すなわち、リン酸存在下でマルトースに作用させると、等モルのグルコースとβ-グルコース-1-リン酸を生成し、グルコースとβ-グルコース-1-リン酸に作用させると等モルのマルトースとリン酸を生成する。

【化1】

0%以上を示した（図1）。

【0076】(4) 熱安定性

10mM酢酸緩衝液（pH6.0）中にてインキュベートし、残存活性を測定したところ、60℃で15分間処理で、無処理の80%以上の活性を示した（図2）。

【0077】(5) 至適pH

25mMリン酸カリウム・クエン酸緩衝液（pH4.0～8.0）と25mMトリス塩酸緩衝液（pH7.5～9.0）を用いて反応を行ったところ、至適pHは6.0～7.0であった（図3）。

【0078】(6) pH安定性

100mMリン酸カリウム・クエン酸緩衝液（pH4.0～8.0）と100mMトリス塩酸緩衝液（pH7.5～9.0）を用いて4℃で24時間インキュベートし、各pHでの残存活性を測定したところ、pH5.5～8.0で安定であった（図4）。

【0079】(7) 失活

100℃、10分間の加熱で100%失活する。

【0080】(8) 分子量

Superdex200pg（ファルマシア バイオテック（株））を用いたゲル透過クロマトグラフィーにより、各種標準タンパク質との相対溶出容量の比較から分子量を求めた結果、本酵素の分子量は15万～19万であった。

【0081】また、SDSゲル電気泳動により、各種標準タンパク質との相対移動度から分子量を求めた値は7.5万～9.5万であった。

【0082】(9) 等電点

等電点電気泳動により、各種標準タンパク質との相対移動度から等電点は4.7～5.1であった。

【0083】(10) 阻害剤

1 mMのHgCl₂で99%、ZnSO₄で37%の活性阻害が見られた(表2)。

【表2】

阻害剤

阻 害 剤*	相 対 活 性 (%)
FeCl ₃	94
MgCl ₂	100
MnSO ₄	111
CaCl ₂	101
Pb(CH ₃ COO) ₂	99
Ba(OH) ₂	100
ZnSO ₄	63
CuSO ₄	91
HgCl ₂	1
EDTA・2Na	100
β-メルカプトエタノール	94
DTT	101
PCMB	20
無添加	100

*1 mM

(11) N末端アミノ酸配列

常法により、アブライド・バイオシステムズ製気相プロテインシーケンサー「477A型」を使用して分析を行ったところ、この酵素は、N末端に配列番号2に示すアミノ酸配列を有していた。

【0084】[2] 耐熱性マルトースホスホリラーゼのDNAの配列解析

本発明者らは、上記の(11)のN末端アミノ酸配列に基づき、バチルス・sp. RK-1株の染色体DNAから耐熱性マルトースホスホリラーゼをコードするDNAを取得し、その配列の解析を行った(配列番号3)。

【0085】まず、バチルスsp. RK-1株の菌体よりリゾチームとSDSを用いた凍結融解法により染色体DNAを調製し、この染色体DNAをテンプレートとし、配列番号2に示すマルトースホスホリラーゼのN末端の1から8番目のアミノ酸配列に基づき、5'-ATGTAYTAYAAYCGICTITTYGA-3'及び5'-ATGTAYTAYAAYAGRTTTRTTYGA-3'で表される配列のオリゴヌクレオチドをプライマーとして、PCRを行った。生成した約400塩基対のDNA断片をプラスミドベクターpUC18に挿入し、クローニングした後、蛍光ラベルを用いたダイブライマー法で塩基配列を決定し、マルトースホスホリラーゼのN末端から5番目のArg以降をコードする381塩基対のDNA断片を単離した。

【0086】そこで、次に、このDNA断片をプローブとして、Hind III、BamH I、Pst I、Sal I、EcoR I等の各種制限酵素で切断した染色体DNAとサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、約2,500塩基対のHind III切断DNA断片が相同性を示したので、この断片の塩基配列をインバースPCR法によって解析した。この解析した塩基配列の3'側に制限酵素BstP I認識配列が検出されたことから、次に、染色体DNAを制限酵素BstP Iで切断後、上記のHind III切断DNA断片と同様に、インバースPCR法によって、約4,000塩基対のBstP I切断断片の塩基配列の解析を行った。3種類のDNA断片の塩基配列解析結果より、耐熱性マルトースホスホリラーゼをコードする全塩基配列を決定することができた。その配列を配列番号3に示す。

【0087】[3] 組換え耐熱性マルトースホスホリラーゼのDNAの単離・同定とその製造：耐熱性マルトースホスホリラーゼの構造遺伝子を含むDNA断片の塩基配列が決定できたことから、該マルトースホスホリラーゼをコードするDNA配列の開始コドン上流169塩基目からの配列5'-TTGCTGCAGGATGCCCTTCA-3'で表されるオリゴヌクレオチドと、終止コドン下流180塩基目からの配列のアンチセンス配列5'-AAACTGCAGGCGGATGTCATAACCATTTGT-3'で表されるオリゴヌクレオチドをプライマーとして、前記の染色体DNAをテンプレートとしたPCRを行い、耐熱性マルトースホスホリラーゼ構造遺伝子を含む約2,700塩基対のDNA断片を調製した。これをプラスミドベクターpCR2.1にライゲーションして、組換えプラスミドpRMP1を作製し、大腸菌INVαF⁺(endA1, recA1, hsdR17(r⁻K, m⁺K), supE44, λ⁻, thi-1, gyrA, relA1, φ80 lacZ ΔM15Δ(lacZYA-argF), deoR⁺, F⁺)株へ導入を行い、形質転換された大腸菌RMP1を得た。

【0088】そして、上記の形質転換体中の組換えプラスミドpRMP1に挿入されている約2,700塩基対のDNA断片の塩基配列の解析を行った。その結果は、配列番号1に示す通りであり、前記の耐熱性マルトースホスホリラーゼのDNA配列の配列番号3の1506~4155と一致することが確認された。

【0089】そこで、形質転換大腸菌RMP1をジャー培養し、組換え耐熱性マルトースホスホリラーゼ粗酵素の調製を行った。培養は、容量5 lのファーメンターにポリペプトン2%、酵母エキス1%、グルコース0.5%、NaCl 0.5%、MgSO₄ 0.05%を含有する培地(pH 7.0)約3 lを入れて滅菌後、予め過減菌したアンピシリン水溶液を100 mg/lになるよ

うに添加し、温度を35℃とした後、種培養液2V/V%を接種して、35℃、pH6.5~7.5に保持しながら24時間通気攪拌培養した。

【0090】培養終了後、培養液中の菌体破壊を行い、これを除去した粗酵素液を調製した。粗酵素液のマルトースホスホリラーゼ活性は2,100単位/mlで、マルターゼ活性は検出されなかった。

【0091】更に、実施例3に示すとおり、この粗酵素を精製し、組換え耐熱性マルトースホスホリラーゼの精製標品を得た。

【0092】本発明の組換え型耐熱性マルトースホスホリラーゼの性質は、以下の通りである。

【0093】(1) 作用

前記の式1で示すように、マルトースを可逆的に加リン酸分解する。すなわち、リン酸存在下でマルトースに作用させると、等モルのグルコースとβ-グルコース-1-リン酸を生成し、グルコースとβ-グルコース-1-リン酸に作用させると等モルのマルトースとリン酸を生成する。

【0094】(2) 基質特異性

トレハロース、ネオトレハロース、マルトース、イソマルトース、セロビオース、シュクロース、p-ニトロフェノール-α-グルコシド、p-ニトロフェノール-β-グルコシドを基質として加リン酸分解反応を行ったところ、マルトース以外にはグルコースの生成がほとんど認められなかった。

【0095】(3) 至適温度

25mMリン酸カリウム・クエン酸緩衝液(pH6.0)中で各種温度(40~85℃)で反応させたところ、マルトース加リン酸分解反応の至適温度は60℃~70℃付近で、50℃~70℃の範囲で最高活性の約50%以上を示した。

【0096】(4) 熱安定性

10mM酢酸緩衝液(pH6.0)中にてインキュベートし、残存活性を測定したところ、60℃で15分間処理で、無処理の80%以上の活性を示した。

【0097】(5) 至適pH

25mMリン酸カリウム・クエン酸緩衝液(pH4.0~8.0)と25mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5~9.0)を用いて反応を行ったところ、至適pHは6.0~7.0であった。

【0098】(6) pH安定性

100mMリン酸カリウム・クエン酸緩衝液(pH4.0~8.0)と100mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5~9.0)を用いて4℃で24時間インキュベートし、各pHでの残存活性を測定したところ、pH5.5~8.0で安定であった。

【0099】(7) 失活

100℃、10分間の加熱で100%失活する。

【0100】(8) 分子量

Superdex200pg(ファルマシア バイオテック(株))を用いたゲル濾過クロマトグラフィーにより、各種標準タンパク質との相対溶出容量の比較から分子量を求めた結果、本酵素の分子量は15万~19万であった。

【0101】また、SDSゲル電気泳動により、各種標準タンパク質との相対移動度から分子量を求めた値は7.5万~9.5万であった。

【0102】(9) 等電点

等電点電気泳動により、各種標準タンパク質との相対移動度から等電点は4.7~5.1であった。

【0103】(10) 阻害剤

1mMのHgCl₂で99%、ZnSO₄で37%の活性阻害が見られた。

【0104】(11) N末端アミノ酸配列

常法により、アブライド・バイオシステムズ製製相プロテインシーケンサー「477A型」を使用して分析を行ったところ、精製酵素はN末端に配列番号2に示すアミノ酸配列を有していた。

【0105】この組換え型耐熱性マルトースホスホリラーゼの酵素化学的特性は、バチルス・sp. RK-1の由来の耐熱性マルトースホスホリラーゼの酵素学的性質とほぼ一致するものであった。

【0106】従って、前述の組換え型耐熱性マルトースホスホリラーゼをコードするDNAは、バチルス・sp. RK-1の由来のものであると判断した。

【0107】[4] トレハロース又はβ-グルコース-1-リン酸の製造

組換え型耐熱性マルトースホスホリラーゼ及び耐熱性トレハロースホスホリラーゼの存在下に、マルトースとリン酸もしくはリン酸塩とを、水性媒体中で、反応させて、トレハロース又はβ-グルコース-1-リン酸を製造する方法について、以下述べる。

【0108】この反応に用いられる組換え耐熱性マルトースホスホリラーゼとしては、pH6.0の緩衝液、例えば10mMリン酸カリウム・クエン酸緩衝液(pH6.0)中で、50~65℃のいずれかの温度で、好ましくは55~65℃のいずれかの温度で、特に60℃で15分処理後に無処理の80%以上の活性を有するものが好適に用いられる。これらの酵素は、精製酵素であっても、マルターゼ等のトレハロースの製造に悪影響を及ぼす酵素を含まない粗酵素であってもよい。また、さらにこれを酵素の常法により担体に固定した固定化酵素を用いることも可能である。

【0109】また、この反応に用いる耐熱性トレハロースホスホリラーゼとしては、上記反応温度のいずれかで、及び上記pH範囲のいずれかで、組換え型耐熱性マルトースホスホリラーゼの助力の下に、マルトースとリン酸もしくはリン酸塩からトレハロースを生産し得るものであればよい。

【0110】しかしながら、好適にはpH6.0の緩衝液、例えば10mMリン酸カリウム・クエン酸緩衝液(pH6.0)中で、50~65℃のいずれかの温度で、好ましくは55~65℃のいずれかの温度で、特に60℃で15分処理後に無処理の80%以上の活性を有する耐熱性トレハロースホスホリラーゼを用いることができる。かかる性質を有する耐熱性トレハロースホスホリラーゼの例として、本発明者らによって見出されたバチルス・ステアロサーモフィラスSK-1(FERM P-14567)が産生する耐熱性トレハロースホスホリラーゼを挙げることができる。

【0111】耐熱性トレハロースホスホリラーゼは組換え型耐熱性マルトースホスホリラーゼと同様、精製酵素であっても粗酵素であってもよい。

【0112】マルトースとしてはマルトースまたはマルトース含有物(例えばマルトース高含有糖液)を用いることができる。リン酸塩としてはリン酸三カリウム(もしくはナトリウム)、リン酸水素二カリウム(もしくはナトリウム)、リン酸二水素カリウム(もしくはナトリウム)等の水溶性リン酸塩を用いることができる。水性媒体としては水、緩衝液等が挙げられる。緩衝液としては酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、コハク酸緩衝液、トリス・塩酸緩衝液等を用いることができる。

【0113】酵素の使用量については特に制限はないが、マルトース1gに対して各酵素とも、0.1~50単位、好ましくは1~20単位使用するのが好適である。また、組換え型耐熱性マルトースホスホリラーゼと耐熱性トレハロースホスホリラーゼとの使用比率は特に制限はないが、単位の比で前者:後者=1:5~5:1、好ましくは1:2~2:1が適当である。

【0114】リン酸及び/またはリン酸塩はマルトースに対して、特に制限はないが、0.001~1倍モル、好ましくは0.005~0.5倍モル使用するのが適当である。尚、緩衝液がリン酸(塩)を含有する場合は系中のリン酸及びリン酸塩の総量が上記範囲であればよい。

【0115】上記反応は温度、雑菌汚染をさらに避けるとともに収率を上げるため、好ましくは55~70℃、好ましくは55~65℃、更に好ましくは60~65℃で行う。pHは一般に4.5~8.0、好ましくは5.0~6.0で行うのが適当である。上記条件で十分なトレハロース生成が見られた時点で反応を終了するが、反応は通常1~144時間で終了する。

【0116】反応終了後、反応液の加熱による酵素の失活、pHの低下(塩酸等の酸の添加)による酵素の失活等の適当な手段で反応を停止させ、活性炭処理、イオン交換樹脂処理、エタノール晶出処理等の単離・精製手段を適宜組み合わせてトレハロースを得ることができる。

【0117】また、本発明は、組換え型耐熱性マルトースホスホリラーゼの存在下にマルトースとリン酸もしくはリン酸塩とを、水溶液中で反応させて、β-グルコース-1-リン酸を製造することでもある。

【0118】その場合、この反応に用いられる組換え型耐熱性マルトースホスホリラーゼ、マルトース、水溶液は、トレハロース製造の場合と同様にして行うことができる。酵素はマルトース1gに対して0.1~50単位、好ましくは1~20単位が好適である。

【0119】反応温度、反応pH、反応時間はトレハロース製造の場合と同様にして行うことができる。反応終了後、イオン交換樹脂処理等の単離・精製手段を適宜組み合わせてβ-グルコース-1-リン酸を得ることができる。

【0120】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態を実施例により詳細に説明する。

【0121】マルトースホスホリラーゼ活性は、以下のよう測定した。

【0122】適宜希釈した酵素溶液0.4mlと0.5Mリン酸クエン酸緩衝液(pH6.0)0.06ml、2W/V%マルトース0.6ml、蒸留水0.14mlを混合し、60℃、15分反応後10分間の煮沸によって反応を停止させた。次に、この反応停止液から0.02mlを採取し、グルコース検査試薬グルコースCII-テストワコー(和光純薬工業(株))を3ml加え、室温で20分間反応させた後、505nmでの吸光度を分光光度計を用いて測定し、反応液中のグルコース量を定量した。生成したグルコースの量から1分間に1μmolのマルトースを加リン酸分解した酵素量を1単位とした。

【0123】

【実施例1】 精製マルトースホスホリラーゼの酵素化学的特性

【実施例1-1】 精製酵素の調製
バチルスsp. RK-1(FERM P-15044)による耐熱性マルトースホスホリラーゼの精製は以下のように行った。

【0124】(培養)酵母エキス1%、ポリペプトン2%、マルトース1%を含有する培地(pH7.0)100mlを500mlバッフル付きマイヤーフラスコに入れ、121℃、20分間オートクレーブ殺菌したものに、バチルスsp. RK-1を1白金耳接種し、55℃にて16時間振とう培養したものを種培養液とした。

【0125】容量5lのフェーメンターに種培養の場合と同組成の培地約3lを入れて滅菌し、温度を55℃とした後、種培養液2V/V%を接種し、55℃、pH6.0~7.0に保持しながら18時間通気攪拌培養した。

【0126】(粗酵素調製)分離した培養液に硫酸を40~60%の飽和溶液になるよう溶解し、生じたタンバ

ク質の沈澱を遠心分離によって回収して、10mM酢酸緩衝液(pH6.0)に溶解後、同じ緩衝液に対して透析を行い、濃縮後マルトースホスホリラーゼ活性285単位/ml、マルターゼ活性65単位/mlの粗酵素液を10ml得た。尚、マルターゼ活性の単位はマルトースを基質として反応を行い、1分間に遊離したグルコースの μmol 数とした。

【0127】(イオン交換クロマトグラフィー) 10mM酢酸緩衝液(pH6.0)によって平衡化したTSK gel DEAEトローバル650M(東ソー(株))を詰めたカラムに、粗酵素液を添加し、0~0.5MNaClの上昇濃度勾配によって溶出し、分画分取した。活性のある画分は合わせて濃縮、脱塩後、更に、一連の同じクロマトグラフィー操作を行い精製度を上げた。

【0128】(ゲル透過クロマトグラフィー) 0.2MNaClを溶解した10mM酢酸緩衝液(pH6.0)によって平衡化した、Superdex200pgカラム(ファルマシア バイオテック(株))に、上記部分精製酵素液を添加し、同じ緩衝液で溶出し、分画分取した。活性のある画分は濃縮、脱塩を行った。

【0129】(等電点クロマトグラフィー) 25mMビス・トリス塩酸緩衝液(pH7.1)によって平衡化した、Mono P HR5/20カラム(ファルマシア バイオテック(株))に上記部分精製酵素液を添加し、pH4.0に調製した展開緩衝液Polybuffer(ファルマシア バイオテック(株))で溶出し、分画分取した。活性のある画分は濃縮、脱塩を行った。

【0130】(ネイティブポリアクリルアミドゲル電気泳動) 上記精製酵素をネイティブポリアクリルアミドゲル電気泳動し、ゲルをCBB染色してタンパク質のバンドを調べたところ一本のバンドしか検出されず、単一タンパク質であることが確認できたので精製マルトースホスホリラーゼ酵素液とした。

【0131】[実施例1-2] 精製酵素の酵素化学的特性

実施例1-1で調製した精製マルトースホスホリラーゼ液を用い、以下の酵素化学的特性を調べた。

【0132】(1) 作用

実施例1-1で調製した精製酵素液0.4mlと0.5Mリン酸クエン酸緩衝液(pH6.0)0.06ml、2W/V%マルトース0.6ml、蒸留水0.14mlを混合し、60℃、60分間マルトース分解反応を行った。反応後10分間の煮沸によって反応を停止させ、この反応停止液から0.02mlを採取し、グルコース検査試薬グルコースCII-テストワコー(和光純薬工業(株))を3ml加え、室温で20分間反応させた後、505nmでの吸光度を分光光度計を用いて測定し、反応液中のグルコース量を定量した。一方、陰イオン交換カラムと示唆屈折計を用いた高速液体クロマトグラフィ

により、反応液中の β -グルコース-1-リン酸を定量した。その結果、反応停止液中のグルコース含量と β -グルコース-1-リン酸含量は等しかった。

【0133】また、精製酵素液0.4mlと0.5M酢酸緩衝液(pH6.0)0.12ml、0.5M β -グルコース-1-リン酸・Na水溶液0.12ml、0.5Mグルコース水溶液0.12ml、蒸留水0.44mlを混合し、60℃、60分反応後10分間の煮沸によって反応を停止させた。次に、この反応停止液から0.02mlを採取し、グルコース検査試薬グルコースCII-テストワコー(和光純薬工業(株))を3ml加え、室温で20分間反応させた後、505nmでの吸光度を分光光度計を用いて測定し、反応液中のグルコース量を定量した。一方、反応停止液をTSK gel Amido80カラム(東ソー(株))を用いた高速液体クロマトグラフィーで分離後、示差屈折計で反応液のマルトースを検出し定量した。

【0134】その結果、反応停止液中の消費グルコース量と生成マルトース量は等しかった。従って、精製酵素の作用は、式(1)で示すように、マルトースを可逆的に加リン酸分解する。すなわち、リン酸存在下でマルトースに作用させると、等モルのグルコースと β -グルコース-1-リン酸を生成し、グルコースと β -グルコース-1-リン酸に作用させると等モルのマルトースとリン酸を生成すると結論した。

【0135】(2) 基質特異性

(1)のマルトース分解反応の基質を以下のものに置き換えて加リン酸分解反応を行ったところ、トレハロース、ネオトレハロース、イソマルトース、セロビオース、シュークロース、p-ニトロフェノール- α -グルコシド、p-ニトロフェノール- β -グルコシドを基質として加リン酸分解反応を行ったところ、いずれもグルコースの生成が認められなかった(表1)。

【0136】(3) 至適温度

精製マルトースホスホリラーゼ活性を各種温度(40~85℃)で行ったところ、マルトース加リン酸分解反応の至適温度は60℃~70℃付近で、50℃~70℃の範囲で最高活性の約50%以上を示した(図1)。

【0137】(4) 熱安定性

精製酵素液を各種温度(40~75℃)に15分間インキュベートした後、マルトースホスホリラーゼ活性を測定したところ、60℃処理で、無処理の80%以上の活性を示した(図2)。

【0138】(5) 至適pH

マルトースホスホリラーゼ活性測定に用いる0.5Mリン酸クエン酸緩衝液(pH6.0)の代わりに、0.5Mリン酸カリウム・クエン酸緩衝液(pH4.0~8.0)もしくは0.5Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5~9.0)を用いて反応を行ったところ、至適pHは6.0~7.0であった(図3)。

【0139】(6) pH安定性

精製マルトースホスホリラーゼ酵素液を100mMリン酸カリウム・クエン酸緩衝液(pH4.0~8.0)と100mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5~9.0)と混合し、4℃で24時間インキュベートした後、各pHでの残存活性を測定したところ、pH5.5~8.0で安定であった(図4)。

【0140】(7) 失活

精製マルトースホスホリラーゼ酵素液を100℃、10分間加熱した後、残存活性を測定したところ、活性は100%失活していた。

【0141】(8) 分子量

Superdex200pg(ファルマシア バイオテク(株))を用いたゲル透過クロマトグラフィーにより、各種標準タンパク質との相対溶出容量の比較から分子量を求めた結果、精製酵素の分子量は15万~19万であった。

【0142】また、SDSゲル電気泳動により、各種標準タンパク質との相対移動度から分子量を求めた値は7.5万~9.5万であった。

【0143】(9) 等電点

等電点電気泳動により、各種標準タンパク質との相対移動度から等電点は4.7~5.1であった。

【0144】(10) 阻害剤

精製マルトースホスホリラーゼ酵素液に終濃度1mMになるように阻害剤を添加した後、残存活性を測定したところ、 HgCl_2 で99%、 ZnSO_4 で37%の活性阻害が見られた(表2)。

【0145】(11) N末端アミノ酸配列

常法により、アブライド・バイオシステムズ製気相アプロテインシーケンサー「477A型」を使用して分析を行ったところ、精製酵素はN末端に配列表における配列番号2に示すアミノ酸配列を有していた。

【0146】

【実施例2】 耐熱性マルトースホスホリラーゼをコードするDNAを含む組換えDNA及び組換えDNA形質転換大腸菌の調製

【実施例2-1】 染色体DNAの調製

ポリペプトン1%、酵母エキス0.5%、 NaCl 0.5%を含有する培地(pH7.0)100mlを500mlバッフル付フラスコに入れ、121℃、20分間オートクレーブ殺菌したものにバチルスsp. RK-1株を接種し、55℃で14時間回転培養した。遠心分離により培養液から菌体を分離し、0.1MEDTAを含む0.15M NaCl 溶液(pH8.0)に懸濁した。これにリゾチームを2mg/mlとなるように加え、37℃で30分間穏やかに振とうした後、-80℃で30分間凍結した。解凍後、1%SDSと0.1M NaCl を含む0.1Mトリス-HCl緩衝液(pH9.0)を加えて60℃に加温した。冷却後、1mMEDT

Aを含む10mMトリス-HCl緩衝液(pH8.0)(TE緩衝液)で飽和したフェノール溶液を加えて除蛋白処理を行った。その後、冷エタノールを加え、生成した粗染色体DNAを採取し、これを70%、80%、90%エタノールにそれぞれ5分間ずつ浸した後、TE緩衝液に溶解した。これにRNaseA(シグマ)を20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように加え、37℃で30分間反応させた。反応液を再度フェノール溶液による除蛋白処理を行い、冷エタノールを加えて生成した染色体DNAを採取し、70%、80%、90%エタノールにそれぞれ5分間ずつ浸した後、1mg/mlとなるようにTE緩衝液に溶解し、染色体DNA溶液とした。

【0147】【実施例2-2】 マルトースホスホリラーゼをコードするDNAの5'端DNA断片の取得
配列表における配列番号2に示すマルトースホスホリラーゼのN末端の1から8番目のアミノ酸配列のMet-Tyr-Tyr-Asn-Arg-Leu-Phe-Aspで表される配列に基づき、5'-ATGTAYTAYAAAYCGNCTNTTYGA-3'及び5'-ATGTAYTAYAAAYAGRTTTRTTYGA-3'で表される配列のオリゴヌクレオチドを化学合成した。これらのオリゴヌクレオチドをプライマーとし、実施例2-1で得られた染色体DNAをテンプレートとしてGeneAmp PCR Reagent Kit with AmpliTaq DNA Polymerase(宝酒造(株))を用いてPCRを行った。反応条件は、93℃で2分間加熱した後、95℃で1分、55℃で1分30秒、72℃で3分のサイクルを30回繰り返してから、最後に72℃で15分保温した。

【0148】アガロースゲル電気泳動で調べたところ、約400塩基対のDNA断片が生成していることが判明した。この断片をDE81ペーパー(ワットマン)を用いてアガロースゲルから回収し、T4ポリメラーゼ及びクレノウフラグメントを作用させて断片の末端を平滑化した。このDNA断片をRTGpUC18 SmaI/BAP+Ligase(ファルマシア)を用いてプラスミドベクターpUC18のSmaI部位に挿入した。そして、この組換えプラスミドをコンピテントセルE.coli JM109(宝酒造(株))100 μl に加えて、氷冷下に30分間静置後、42℃で45秒間加熱し、SOC培地を加えて37℃で1時間振とう培養することにより、組換えプラスミドを導入した形質転換大腸菌を得た。

【0149】得られた大腸菌から組換えプラスミド抽出し、このプラスミドをテンプレートとして、プラスミドベクターpUC18のDNAを基に化学合成により作製した、2種類の合成オリゴヌクレオチドFP(5'-GTTTCCAGTCACGACG-3')及びRP(5'-GAATTGTGAGCGGATAAC-3')をプライマーとして、前述の反応条件でPCRを行

い、pUC18に挿入したDNA断片の増幅を行った。反応液90 μ lにPEG溶液(20%ポリエチレングリコール、2.5MNaCl)を60 μ l加えて混合し、水中に15分間静置した。遠心分離により沈殿したDNA断片を分離し、70%エタノールで洗浄後、真空乾燥した。これを適量の蒸留水に溶解し、塩基配列決定用DNAを調製した。このDNAをテンプレートとし、PRISM Dye Primer Cycle Sequencing Ready Reaction Kit(パーキンエルマー)を用いたジデオキシ・チェーン・ターミネーター法によりDNA断片の蛍光ラベルを行い、DNAシーケンサー373A(Applied Biosystems)で分析して塩基配列を決定した。結果、マルトースホスホリラーゼのN末端から5番目のArg以降をコードする381塩基対のDNA断片であることが判明した。

【0150】[実施例2-3] 耐熱性マルトースホスホリラーゼをコードするDNA配列を含むDNA断片の取得とその塩基配列の決定

実施例2-1で調製した染色体DNAをHind III、BamHI、Pst I、Sal I、EcoRI等の各種制限酵素で切断し、アガロースゲル電気泳動を行った。分離したDNA断片を常法によりナイロン膜Gene Screen Plus Hybridization Transfer Membrane(デュボン)に固定した。実施例2-2で得た381塩基対のDNA断片をRandom Primer DNA Labeling Kit(宝酒造(株))を用いたランダムプライマーDNAラベリング法により放射性同位体 32 Pで標識後、前記ナイロン膜上に固定したDNA断片とSouthern, E. M. の方法(J. Mol. Biol., 98:503-517, 1975)に従ってサザンハイブリダイズさせた。条件は、5XSSC、1%SDS、10%硫酸デキストラン、0.5mg/mlサグ変性DNAからなる溶液において、65℃で16~20時間ハイブリダイズを行い、その後2XSSC、1%SDSからなる溶液にて65℃で30分間のサイクルで3回ナイロン膜を洗浄した。

【0151】その結果、制限酵素Hind IIIで切断して生成した約2,500塩基対のDNA断片がハイブリダイズした。

【0152】そこで、実施例2-2で得た381塩基対のDNA断片の塩基配列を基に、5'-GATGGTCACCGGAATAAGTCTCTTC-3'及び5'-GATAAAACCAGGGTTGGCTGGTGA-3'で表されるオリゴヌクレオチドML及びMRを化学合成した。一方、染色体DNAをHind IIIで切断後、DNA Ligation Kit(宝酒造(株))を用いてライゲーションを行ったDNAをテンプレート、ML及びMRをプライマーとしてGeneA

mp XL PCR Kit(パーキンエルマー)を用いてPCRを行った。反応条件は、95℃で3分間加熱後、95℃で30秒間、65℃で8分間のサイクルを32回繰り返してから、最後に72℃で12分間保温した。反応液をアガロースゲル電気泳動したところ、約2,500塩基対のDNA断片が検出されたので、アガロースゲルよりこのDNA断片をDE81ペーパー(ワットマン)を用いて抽出した。抽出したDNA断片は超音波処理によって500~1000塩基対の大きさに小断片化した後、RTGpUC18SmaI/BAP+Ligase(ファルマシア)を用いてプラスミドベクターpUC18のSmaI部位に挿入した。そして、この組換えプラスミドをコンピテントセルE. coli JM109(宝酒造(株))を用いて大腸菌JM109に導入した。

【0153】得られた形質転換大腸菌から組換えプラスミドを抽出し、このプラスミドをテンプレート、オリゴヌクレオチドFP及びRPをプライマーとして実施例2-2と同じ反応条件でPCRを行った。反応液から増幅したDNA断片を精製し、塩基配列決定用DNAを調製した。そして、このDNA断片をテンプレートとしてPRISM TM Dye Primer Cycle Sequencing Ready Reaction Kit(パーキンエルマー)を用いた蛍光ラベル反応を行い、DNAシーケンサー373A(Applied Biosystems)で分析して塩基配列を決定した。決定した全ての塩基配列をコンピュータソフトGENETYX-MAC(ソフトウェア開発(株))を用いて解析し、約2,500塩基対のDNA断片の塩基配列を決定した。

【0154】次に、この決定した配列の3'側に見られる制限酵素BstPI認識配列以降の塩基配列を基に、5'-GCGACAGAAAGATACATCGGCACAG-3'及び5'-ATCTCCGGAAGTAA CGAGGAACCTTG-3'で表されるオリゴヌクレオチドML2及びMR2を化学合成した。一方、染色体DNAを制限酵素BstPIで切断した後、上述と同様にライゲーションしたDNAをテンプレート、ML2及びMR2をプライマーとして実施例2-2と同じ反応条件でPCRを行った。反応液をアガロースゲル電気泳動したところ約4,000塩基対のDNA断片が検出された。そこで、この約4,000塩基対のDNA断片の塩基配列の決定を行った。その結果、先に決定したマルトースホスホリラーゼをコードするDNA断片の3'端以降の配列が決定できた。両配列より決定した耐熱性マルトースホスホリラーゼをコードする塩基配列を配列表における配列番号3に示す。

【0155】[実施例2-4] 組換えプラスミドpRMP1と形質転換大腸菌RMP1の調製
実施例2-3で決定した塩基配列より、マルトースホス

ホリラーゼをコードするDNA配列の開始コドン上流169塩基目からの配列5'-TTGCTGCAGGATGCCCTTCA-3'で表されるオリゴヌクレオチド5MPと、終止コドン下流180塩基目からの配列のアンチセンス配列5'-AAACTGCAGGCGGATGTCATAACCATTGT-3'で表されるオリゴヌクレオチド3MPを化学合成した。実施例2-1で調製した染色体DNAをテンプレートとし、5MPと3MPをプライマーとして実施例2-2と同じ反応条件でPCRを行い、2,655塩基対のDNA断片を得た。

【0156】この2,655塩基対のDNA断片を、Original TA Cloning Kit (Invitrogen)を用いて、pCR2.1にライゲーション後、大腸菌INVaF' (endA1, recA1, hsdR17 (r⁻k, m⁺k), supE44, λ⁻, thi-1, gyrA, relA1, φ80lacZΔM15Δ (lacZYA-argF), deoR⁺, F')株への導入を行い、2,655塩基対のDNA断片が組み込まれた組換えプラスミドpRMP1 (図5)を有する形質転換大腸菌RMP1を得た。

【0157】上記の形質転換大腸菌RMP1をEscherichia coli RMP1と命名し(受託番号:FERM P-16132)、工業技術院生命工学工業技術試験所に平成9年3月12日に寄託した。

【0158】そして、形質転換大腸菌RMP1を培養し、培養液から組換えプラスミドpRMP1を抽出し、導入した2,655塩基対のDNA断片の塩基配列の解析を行った。その塩基配列を、配列表の配列番号1に示す。

【0159】この配列より、組み込んだ2,655塩基対のDNA断片の塩基配列は、実施例2-3で決定した耐熱性マルトースホスホリラーゼのDNA配列の配列番号3の1506~4160と一致することが判明し、組換え耐熱性マルトースホスホリラーゼをコードしていることが確認できた。

【0160】

【実施例3】 形質転換大腸菌RMP1が生産する組換え耐熱性マルトースホスホリラーゼの酵素化学的特性

【実施例3-1】 組換え耐熱性マルトースホスホリラーゼの精製

バクトトリプトン1.6%、酵母エキス1.0%、NaCl 0.5%を含有する培地(pH7.0)100mlを500ml三角フラスコに入れ、121℃、20分間オートクレーブ殺菌した後、濾過滅菌した10mg/mlアンピシリン水溶液0.5mlを添加したものに、実施例2で得られた形質転換大腸菌RMP1を1白金耳接種し、37℃で16時間回転振とう培養したものを種培養液とした。

【0161】容量5lのファーマンターにポリペプトン2%、酵母エキス1%、グルコース0.5%、NaCl

0.5%、MgSO₄ 0.05%を含有する培地(pH7.0)約3lを入れて滅菌後、予め濾過滅菌したアンピシリン水溶液を100mg/lになるように添加し、温度を35℃とした後、種培養液2V/V%を接種して、35℃、pH6.5~7.5に保持しながら24時間通気攪拌培養した。

【0162】培養終了後、培養液を連続的に超音波処理して菌体の破壊を行った。これを遠心分離し菌体残渣を除去した培養液上清を得た。この上清を限外濾過によって約100mlまで濃縮した後、10mM酢酸緩衝液(pH6.0)を3l加えて、再度100mlまで濃縮し、粗酵素液を得た。粗酵素液のマルトースホスホリラーゼ活性は2,100単位/mlで、マルターゼ活性は検出されなかった。

【0163】そこで、この粗酵素液を実施例1-1と同様にして精製を行い、ネイティブポリアクリルアミドゲル電気泳動で単一タンパク質であることを確認した。

【0164】[実施例3-2] 組換え耐熱性マルトースホスホリラーゼの酵素化学的特性

実施例3-1の精製した組換え耐熱性マルトースホスホリラーゼの酵素化学的特性は実施例1-2と同様にして調べた。以下に結果を示す。

【0165】(1) 作用

マルトースを可逆的に加リン酸分解する。すなわち、リン酸存在下でマルトースに作用させると、等モルのグルコースとβ-グルコース-1-リン酸を生成し、グルコースとグルコース-1-リン酸に作用させると等モルのマルトースとリン酸を生成する。

【0166】(2) 基質特異性

トレハロース、ネオトレハロース、マルトース、イソマルトース、セロビオース、シュクロース、p-トリオフェノール-α-グルコシド、p-ニトロフェノール-β-グルコシドを基質として加リン酸分解反応を行ったところ、マルトース以外にはグルコースの生成が認められなかった。

【0167】(3) 至適温度

25mMリン酸カリウム・クエン酸緩衝液(pH6.0)中で各種温度(40~85℃)で反応させたところ、マルトース加リン酸分解反応の至適温度は60℃~70℃付近で、50℃~70℃の範囲で最高活性の約50%以上を示した。

【0168】(4) 熱安定性

10mM酢酸緩衝液(pH6.0)中にてインキュベートし、残存活性を測定したところ、60℃で15分間処理で、無処理の80%以上の活性を示した。

【0169】(5) 至適pH

25mMリン酸カリウム・クエン酸緩衝液(pH4.0~8.0)と25mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5~9.0)を用いて反応を行ったところ、至適pHは6.0~7.0であった。

【0170】(6) pH安定性
100mMリン酸カリウム・クエン酸緩衝液 (pH4.0~8.0) と100mMトリス塩酸緩衝液 (pH7.5~9.0) を用いて4℃で24時間インキュベートし、各pHでの残存活性を測定したところ、pH5.5~8.0で安定であった。

【0171】(7) 失活
100℃、10分間の加熱で100%失活した。

【0172】(8) 分子量
Superdex 200pg (ファルマシア バイオテック (株)) を用いたゲル濾過クロマトグラフィーにより、各種標準タンパク質との相対溶出容量の比較から分子量を求めた結果、本酵素の分子量は15万~19万であった。

【0173】また、SDSゲル電気泳動により、各種標準タンパク質との相対移動度から分子量を求めた値は7.5万~9.5万であった。

【0174】(9) 等電点
等電点電気泳動により、各種標準タンパク質との相対移動度から等電点は4.7~5.1であった。

【0175】(10) 阻害剤
1mMのHgCl₂で99%、ZnSO₄で35%の活性阻害が見られた。

【0176】(11) N末端アミノ酸配列
常法により、アプライド・バイオシステムズ製気相アミノ酸分析器「477A型」を使用して分析を行ったところ、精製酵素はN末端に配列表における配列番号2に示すアミノ酸配列を有していた。

【0177】この結果から、組換え耐熱性マルトースホスホリラーゼは、耐熱性マルトースホスホリラーゼと同じ酵素化学的性質を有することが確認された。

【0178】

【実施例4】 組換え耐熱性マルトースホスホリラーゼを用いたトレハロースの製造

【実施例4-1】 耐熱性トレハロースホスホリラーゼの調製

肉エキス0.12%、ポリペプトン0.4%、NaCl 0.2%を含有する培地 (pH7.0) 100mlを500mlバッフル付きマイヤーフラスコに入れ、121℃、20分間オートクレーブ殺菌したものに、バチルス・ステアロサーモフィラスSK-1 (FERM P-14567) を1白金耳接種し、55℃にて16時間振とう培養したものを種培養液とした。

【0179】容量5lのファーマンターに酵母エキス1%、ポリペプトン2%、トレハロース1%を含有する培地 (pH7.0) 約3lを入れて滅菌し、温度を55℃とした後、種培養液2V/V%を接種し、55℃、pH6.0~7.0に保持しながら40時間通気攪拌培養した。

【0180】培養終了後、培養物を遠心分離により菌体

を分離し、上清に硫酸を80%飽和に溶解し、析出したタンパク質を遠心分離によって集めた。これを10mM酢酸緩衝液 (pH6.0) に溶解後、同じ緩衝液に対して透析を行い、濃縮後約220単位/ml粗酵素液を20ml得た。

【0181】【実施例4-2】 マルトースからトレハロースの生成反応

実施例4-1で調製した耐熱性トレハロースホスホリラーゼ粗酵素液と実施例3-1で調製した組換え型マルトースホスホリラーゼ粗酵素液を用いて、基質のマルトースに作用させトレハロースへ変換させた。

【0182】反応液はマルトース濃度30W/W%、リン酸濃度10mM、粗酵素各10単位/gとなるように添加し、酢酸緩衝液でpH5.0に調製した。反応は60℃で48時間行った。反応の停止は10分間100℃に加熱して行った。反応終了後、各反応液をTSK Gel Amido 80カラム (東ソー (株))、溶離液アセトニトリル/水 (76/24)、流速0.8ml/min、カラム温度80℃、示差屈折計Shodex (昭和電工 (株)) を検出手段とする高速液体クロマトグラフィーにより反応液の糖組成を定量した。また、β-グルコース-1-リン酸は反応液を陰イオン交換カラムと示差屈折計を用いた高速液体クロマトグラフィーにより定量した。結果、基質マルトースの65%がトレハロースに変換された。

【0183】

【実施例5】 トレハロース含有糖液、及びその粉末の製造

コーンスターチにα-アミラーゼを作用させた澱粉液化液に枝切り酵素プロモザイム (ノボノルディクスバイオ、インダストリー) とβ-アミラーゼ (長瀬産業 (株)) を作用させて調製したマルトース高含有糖液 (固形分30W/W%、固形分当たりのマルトース純度80%) に、実施例4-1で調製した組換え型マルトースホスホリラーゼ粗酵素液と実施例4-2で調製したバチルス・ステアロサーモフィラスSK-1 (FERM P-14567) の耐熱性トレハロースホスホリラーゼ粗酵素液をそれぞれ固形分1g当たり10単位になるように加え、さらに、リン酸濃度10mMになるようにリン酸カリウムを加えて、60℃、pH5.0で48時間反応させ、次いで100℃で10分間加熱して酵素を失活させた。

【0184】この反応液を活性炭で脱色し、イオン交換樹脂で脱塩した後、濃度約75%まで濃縮し、トレハロース含有糖液を得た。この糖液を実施例4-3と同様に高速液体クロマトグラフィーによって分析した結果、固形分当たりの割合はグルコース2.8%、トレハロース63.2%、マルトース20.5%、マルトリオース5.1%、その他マルトオリゴ糖8.4%であった。

【0185】また、前記反応液に固形分1g当たり1単

位になるようにグルコアミラーゼ(生化学工業(株))を加え、55℃で8時間反応させ、次いで100℃で10分間加熱して酵素を失活させた。この反応液を活性炭で脱色し、イオン交換樹脂で脱塩した後、濃度約50%まで濃縮し、ナトリウム型イオン交換カラムで分離を行い、トレハロース画分を分取した。この分取した糖液を濃縮し、固形分75%で固形分当たり95%のトレハロースを含有するトレハロース高含有糖液を得た。

【0186】さらに、このトレハロース高含有糖液を濃縮後乾燥することにより粉末トレハロースを得た。

【0187】以上の結果から、組換え耐熱性マルトースホスホリラーゼを利用して、トレハロースを製造することが出来ることが確認された。

【0188】

【発明の効果】本発明は、本発明者らが見出した、好熱性バチルス属細菌、特にバチルス sp. RK-1 (FERM P-15044) 由来の耐熱性マルトースホスホリラーゼ遺伝子を基に、遺伝子工学的手法により、組換え耐熱性マルトースホスホリラーゼを得、これを用いて組換え微生物を作製したものであって、これを培養すれば、酵素の生産性が飛躍的に上昇し、不純物の少ない、高純度組換え耐熱性マルトースホスホリラーゼを効率よく製造できるDNAを得た点で極めて優れている。

【0189】また、このように、組換え耐熱性マルト-

スホスホリラーゼが工業的規模で大量に、効率よく生産できるようになった結果、これを利用することにより、有用なトレハロースの製造が飛躍的に効率よく製造することができる点においても、非常に価値がある。

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 2655

配列の型: 核酸

鎖の数: 2本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

起源

生物名: バチルス sp

株名: RK-1

配列の特徴

特徴を示す記号: 5' UTR

存在位置: 1..181

特徴を決定した方法: E

特徴を示す記号: CDS

存在位置: 182..2455

特徴を決定した方法: E

特徴を示す記号: 3' UTR

存在位置: 2455..2655

特徴を決定した方法: E

配列

```

TTGCTGCAGG ATGCCCTTCA ATTTTAGCCA TGATTGCCGG CTTTGCAGGT GCTAATATTA    60
CTGTGCTATT GACGATTCAA TCTTTAGGGA TAGTTATTAT CATTGCATTT ATCTTTTTTA    120
GGACTAAGTT TTTATCAGAA GAAAGTATGA ATTAATCAGA TGTTGATGAG GAGGCCCTTT    180
T ATG TAT TAC AAC AGG TTG TTT GAT GTG GAT GAA TGG ACA TTG AAG GCT    229
Met Tyr Tyr Asn Arg Leu Phe Asp Val Asp Glu Trp Thr Leu Lys Ala
      1             5             10             15
GCA CAG CTT GAC CGG GAA CAT ATT CGA CTG CAA GAA AGC CTC ACC TCT    277
Ala Gln Leu Asp Arg Glu His Ile Arg Leu Gln Glu Ser Leu Thr Ser
      20             25             30
TTG GGT AAC GGC TAT ATG GGT ATG CGC GGC AAT TTT GAA GAG ACT TAT    325

```

Leu Gly Asn Gly Tyr Met Gly Met Arg Gly Asn Phe Glu Glu Thr Tyr
 35 40 45
 TCC GGT GAC CAT CAC CAA GGA ACC TAT ATT GCA GGG ATA TGG TAT CCC 373
 Ser Gly Asp His His Gln Gly Thr Tyr Ile Ala Gly Ile Trp Tyr Pro
 50 55 60
 GAT AAA ACC AGG GTT GCC TCG TGG AAA ATC GGT TAT CCG GAC TAC TTT 421
 Asp Lys Thr Arg Val Gly Trp Trp Lys Ile Gly Tyr Pro Asp Tyr Phe
 65 70 75 80
 GGC AAA GTC ATC AAC GCT ATC AAC CTT GTT GGG TTA CGT ATA TGG ATT 469
 Gly Lys Val Ile Asn Ala Ile Asn Leu Val Gly Leu Arg Ile Trp Ile
 85 90 95
 GAT CAG GAA GAA ATT GAT CTA TTT ATT GAT CAC CTT GAA CAA TTT CAA 517
 Asp Gln Gln Gln Ile Asp Leu Phe Ile Asp His Leu Gln Gln Phe Gln
 100 105 110
 CTA GAA CTT GAT ATG AAA AAA GCA GTT TTG CGT CAC TCC TAC ATT GTC 565
 Leu Glu Leu Asp Met Lys Lys Ala Val Leu Arg His Ser Tyr Ile Val
 115 120 125
 AAA CAG CCC GGA AAA ATG GTC AAA ATT GAA ATA TAT CGT TAC GGC AGC 613
 Lys Gln Pro Gly Lys Met Val Lys Ile Glu Ile Tyr Arg Tyr Gly Ser
 130 135 140
 ATT GTT CAT AAA CAA ATT GCG GCT ATC CGG TTC CGT GCA ACG AAT CTT 661
 Ile Val His Lys Gln Ile Ala Ala Ile Arg Phe Arg Ala Thr Asn Leu
 145 150 155 160
 GGA AAA CCG GCT ACC ATC AAG TTG ATG CCG TAT TTG GAT GGA AAT GTA 709
 Gly Lys Pro Ala Thr Ile Lys Leu Met Pro Tyr Leu Asp Gly Asn Val
 165 170 175
 AAA AAT GAA GAC GCG AAT TAT GAT GAG ATG TTT TGG ACG GAC ATC CAT 757
 Lys Asn Gln Asp Ala Asn Tyr Asp Glu Met Phe Trp Thr Asp Ile His
 180 185 190

TCC GAA GTG AAC GAA AAG CGG GCA GCT GTT ATT ACG GAA ACG ATT GAA	805
Ser Glu Val Asn Glu Lys Arg Ala Ala Val Ile Thr Glu Thr Ile Glu	
195 200 205	
AAC CCG TTC GGT GTT CCC CGT TTT ACT GTT GCA GCT ACG ATG GGA TGC	853
Asn Pro Phe Gly Val Pro Arg Phe Thr Val Ala Ala Thr Met Gly Cys	
210 215 220	
AGA ACG GAT GCA ATT TTG ACT ACC CAT CAA GCA AAG CCG TTA TAT GCT	901
Arg Thr Asp Ala Ile Leu Thr Thr His Glu Ala Lys Pro Leu Tyr Ala	
225 230 235 240	
GAA CAA ATT TAT GAA AAA GAG TTA GGG GAA AAC GAA TCT CTT CAC TTA	949
Glu Gln Ile Tyr Glu Lys Glu Leu Gly Glu Asn Glu Ser Leu His Leu	
245 250 255	
GAA AAA ATT ATT GCT GTT ACA ACA AGT AGA GAC TAT GAA AAA GAG CTA	997
Glu Lys Ile Ile Ala Val Thr Thr Ser Arg Asp Tyr Glu Lys Glu Leu	
260 265 270	
TTG TTA TCC CGT GCG TAT GAA TTA CTC GAC CAA GCA TTA GAA AGC GGG	1045
Leu Leu Ser Arg Ala Tyr Glu Leu Leu Asp Gln Ala Leu Glu Ser Gly	
275 280 285	
TAT GAA GAA TTA TTC CAA GAA CAC GCG GCA GCA TGG CAA AAA CGA TGG	1093
Tyr Glu Glu Leu Phe Gln Glu His Ala Ala Ala Trp Gln Lys Arg Trp	
290 295 300	
GAT AAA GCT GAT GTC CGT ATT GTT GGA GAT CCG GAA GCA CAG CAA GGC	1141
Asp Lys Ala Asp Val Arg Ile Val Gly Asp Pro Glu Ala Gln Gln Gly	
305 310 315 320	
ATC CGC TTC AAT TTA TTC CAA CTC TTT TCC ACC TAT TAT GGA GAT GAT	1189
Ile Arg Phe Asn Leu Phe Gln Leu Phe Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp Asp	
325 330 335	
CCA AGA TTA AAC ATT GCT CCA AAA GGT TTT ACC GGT GAA AAA TAC GGA	1237
Pro Arg Leu Asn Ile Gly Pro Lys Gly Phe Thr Gly Glu Lys Tyr Gly	

340	345	350	
GGT GCC ACT TAT TGG GAT ACG GAA GCG TAT GCT GTG CCG ATG TAT CTT	1285		
Gly Ala Thr Tyr Trp Asp Thr Glu Ala Tyr Ala Val Pro Met Tyr Leu			
355	360	365	
TCT GTC GCA TCT CCG GAA GTA ACG AGG AAC TTG CTG CTT TAC CGT TAC	1333		
Ser Val Ala Ser Pro Glu Val Thr Arg Asn Leu Leu Leu Tyr Arg Tyr			
370	375	380	
AAT CAT CTT CCG CAA GCT TAC GAA AAT GCG AAA AAA CTC GGG CTC AAA	1381		
Asn His Leu Pro Gln Ala Tyr Glu Asn Ala Lys Lys Leu Gly Leu Lys			
385	390	395	400
GGT GCT CTA TAT CCA ATG GTC ACA TTC ACA GGG ATT GAA TGT CAC AAT	1429		
Gly Ala Leu Tyr Pro Met Val Thr Phe Thr Gly Ile Glu Cys His Asn			
405	410	415	
GAA TGG GAA ATA ACT TTT GAA GAA ATC CAC CGA AAT GGC GCA ATT GCG	1477		
Glu Trp Glu Ile Thr Phe Glu Gln Ile His Arg Asn Gly Ala Ile Ala			
420	425	430	
TAT GCG ATT TAT AAT TAT GTT AAT TAT ACC GGG GAT AAG GAG TAT ATT	1525		
Tyr Ala Ile Tyr Asn Tyr Val Asn Tyr Thr Gly Asp Lys Glu Tyr Ile			
435	440	445	
AAC CAA TAT GGA ATT GAT GTC CTA GTT GGG ATC AGC CGC TTT TTT GCC	1573		
Asn Gln Tyr Gly Ile Asp Val Leu Val Gly Ile Ser Arg Phe Phe Ala			
450	455	460	
GAC CGA GTT CAT TTC TCG GAA CGA AAG CAA AAA TAC ATG ATT CAT GGT	1621		
Asp Arg Val His Phe Ser Glu Arg Lys Gln Lys Tyr Met Ile His Gly			
465	470	475	480
GTA ACT GGA CCG AAT GAA TAT GAA AAC AAT GTT AAC AAC AAC TGG TAT	1669		
Val Thr Gly Pro Asn Glu Tyr Glu Asn Asn Val Asn Asn Asn Trp Tyr			
485	490	495	
ACA AAC CGG ATT GCT GTC TGG ACG CTT AAA TTT ACA ATC GCA TCA CTC	1717		

Thr Asn Arg Ile Ala Val Trp Thr Leu Lys Phe Thr Ile Ala Ser Leu	
500 505 510	
GAT AAA ATT GGA AAA GAT AAA AAA ACG GCG CTT AAT ATT ACG GAA AAA	1765
Asp Lys Ile Gly Lys Asp Lys Lys Thr Ala Leu Asn Ile Thr Glu Lys	
515 520 525	
GAA CTG ACC CAA TGG CGT GAT ATT ATC GAC CGG ATG TAC TTT CCG TAT	1813
Glu Leu Thr Gln Trp Arg Asp Ile Ile Asp Arg Met Tyr Phe Pro Tyr	
530 535 540	
GAT GAA AAA CTC GGT ATT TTT CTA CAA CAG GAT GGT TTT TTA GAC AAG	1861
Asp Glu Lys Leu Gly Ile Phe Leu Gln Gln Asp Gly Phe Leu Asp Lys	
545 550 555 560	
CCG ATT CAA CCG CTC AGT GCC ATA CCG AGA GAA GAT CTA CCA CTC AAC	1909
Pro Ile Gln Pro Val Ser Ala Ile Pro Arg Glu Asp Leu Pro Leu Asn	
565 570 575	
CAG CAT TGG TCT TGG GAC CGT ATT TTG CGT TCT TGC TAT ATT AAG CAG	1957
Gln His Trp Ser Trp Asp Arg Ile Leu Arg Ser Cys Tyr Ile Lys Gln	
580 585 590	
GCC GAT GTA CTA CAA GGA TTT TAT TTC TTT AAT GAT GAG TTT ACA ATG	2005
Ala Asp Val Leu Gln Gly Phe Tyr Phe Phe Asn Asp Glu Phe Thr Met	
595 600 605	
GAA GAG AAG CAG CCG CAT TTT GAA TTT TAC GAA CCG TTA ACC GTC CAT	2053
Glu Glu Lys Gln Arg His Phe Glu Phe Tyr Glu Pro Leu Thr Val His	
610 615 620	
GAA TCG AGT CTT TCC CCT TGT GTC CAT GCT ATT TTA GCT GCT GAA CTC	2101
Glu Ser Ser Leu Ser Pro Cys Val His Ala Ile Leu Ala Ala Glu Leu	
625 630 635 640	
AGG AAA GAG GAC AAA GCG GTG GAG CTG TAT AAA CCG ACA TCT CGC CTC	2149
Arg Lys Glu Asp Lys Ala Val Glu Leu Tyr Lys Arg Thr Ser Arg Leu	
640 645 650 660	

GAT TTG GAT AAC TAT AAC CAT GAT ACA GAA GAC GGG CTG CAT ATT ACG 2197
 Asp Leu Asp Asn Tyr Asn His Asp Thr Glu Asp Gly Leu His Ile Thr
 665 670 675
 TCG ATG ACC GGA AGT TGG CTC GCA ATC GTC CAT GGT TTT GCT GGG ATG 2245
 Ser Met Thr Gly Ser Trp Leu Ala Ile Val His Gly Phe Ala Gly Met
 680 685 690
 CGT ACG TTC AAT GAA ACA TTG TCT TTT GCC CCG TTT TTA CCA AAA ATT 2293
 Arg Thr Phe Asn Glu Thr Leu Ser Phe Ala Pro Phe Leu Pro Lys Ile
 695 700 705
 TGG GAT GCG TAT GCA TTT AAA ATT AAT TAC CGG AAT CGT CTC CTA GAA 2341
 Trp Asp Ala Tyr Ala Phe Lys Ile Asn Tyr Arg Asn Arg Leu Leu Glu
 710 715 720
 GTA AAA GTA AAC AAA AAG CAC GTA ACG GTT TCC TTG CTT GAA GGG GAA 2389
 Val Lys Val Asn Lys Lys His Val Thr Val Ser Leu Leu Glu Gly Glu
 725 730 735 740
 CCG CTC GAA TTA AAA CTA TTT GGG GAG CCT ATC TAT TTA ACA AAT ACC 2437
 Pro Leu Glu Leu Lys Leu Phe Gly Glu Pro Ile Tyr Leu Thr Asn Thr
 745 750 755
 TAT ACG AAG GAG TAT GTG TGA TCTTGAT AGAATGGTGG AAAAAAGCAG 2485
 Tyr Thr Lys Glu Tyr Val
 760
 TTGTCTATCA AATTTATCCT CGCAGTTTCT ATGATACAAA CGGCGACGGA ATTGGTGATT 2545
 TGCAAGGAAT TATTGAAAAG CTGGATTATT TAAAGAAGT YGGCATTGAC TGTATTTGGA 2605
 TTAGTCCTGT GTACGACTCC CCACAGGATG ACAATGGTTA TGACATCCGC 2655

配列番号2

配列の長さ: 20

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

フラグメントの型: N末端フラグメント

Met Tyr Tyr Asn Arg Leu Phe Asp Val Asp Glu Trp Thr Leu Lys Ala

1

5

10

15

Ala Gln Leu Asp

20

配列番号3

配列の長さ: 5987

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：バチルス sp

株名：RK-1

配列

```
TGATTATTAT TTATCCATTG TTAATTACCG TTCCACAGC TTTCAGGGAA GCGAATATTG 60
TTTCTTTCCA GTTGGATTTA CATTCTAACT GGACGCTGGA TAATTTTCGC GAGCTGTTTA 120
CAAATACGTT GTATAAAAT TGGTATATAA ATACGCTCAT TATTGCAGTT GCCACAATGG 180
TACTTCAAGT CGTAATTGTG ACGCTTGGCG GCTACACTTA CAGTCGTTAC CGTTTTAAGG 240
GCAGGAAATA CAGCTTAGTC TTTTTCCTGA TTATACAAAT GGTTCCAACG ATGGCTGCAT 300
TAACGGCATT CTACGTATTG GCAAACATTT TAAATGCCTT GGATACTTAC TGGTTTTTAA 360
CGCTCCTTTA TGTCGGCGGC GGGATTCCAA TGAATACATG GCTGATGAAA GGATATTTTG 420
ATACTGTACC GCGTGATTG GATGAATCAG CAAGAATCGA TGCTGCGGGG CATTTAAGAG 480
TATTTTGGCA AATCGTCCTT CCGCTTGTA AGCCGATGCT CGCCGTTCAA GCGCTTTGGG 540
```

CATTTATGGG TCCTTTCGGG GATTTCCTGT TAGCAAAATT TTTGCTCAGG ACACCGGAAC 800
ATTTAACAGT TCGGGTTGGT CTGCAACAGT TTATTTCCAA TCCAACATGAT CAAAAAGTGA 880
CCTTGTTCG TGCAGGTGCT TTTTAGCCG CCCTGCCGAT TTGTATTTTA TTTTCTTCC 720
TGCAAAAAAA CTTTGTGTCC GGACTGACTT CCGGTGGCAC AAAAGGGTAG TTATTATCCC 780
TTGATGAATC TTTTAAAAAG TGTGGGGTTA TAGATGGAAC AGATTCAAAG ATTTCTGTCTC 840
AACTATTTTG CAAATATATT TTCACCGGTA AAAATGTATC GGCACAGAGG AGATCTTGGT 900
TGCTTGA AAA TTGCGCTCGT GTTTATTTTC TTAACGCTT GCCTGATTGC ACCGCTCTCA 960
TTATCTTTTG CTGCTACGGA AAGTTTTCAG TTAGGAAAAA TCATGCCAAA TTTATATGAA 1020
GCGGTCAAGA CCGGTTATTC CGGCCCGGCT GTTAACATGA AGATTAAACA TGGCATTCTT 1080
CAAGCTCAAG CCTATGAATT GGTGACGGG GATACACTTA TTCCATTAA TGCAACAAG 1140
GATTTTCTG TTTCCGGTGA TCAGTATCAT AAAAAAGTTG GATCATTATA AAAATGCACC 1200
GGTTTTTCAA AAAAACCGGC TGATCTTCAC TGACGAAAAA GGGTTTGGCT TTTCCGGTACG 1260
CTATCCGCAA AATGACGCAG GAAAAAAGT TCGTAGTGA GACGACCTTG CCGCTTTTGC 1320
AGGAGAGCTC TGGTTTCAGC AATTCAAAAGT CAACCTCAT TCCGTTAATTT CAGGTTCCAT 1380
GTTGCCCATG CTCTTTTCAA GTAAATTTGT TTTAATGGGT GCGGTGTCTC TTATACTTTG 1440
GTTGACAAAG TTTCAAGTT ACTCCGGTAT CCAAACTTTT ATACAGGCAG CAACCATAAC 1500
AATGTTTGTCT GCAGGATGCC CTTCAATTTT AGCCATGATT GCCGGCTTTG CAGGTGCTAA 1560
TATTAAGTGT CTATTGACGA TTCAATCTTT AGGGATAGTT ATTATCATTG CATTTATCTT 1620
TTTTAGGACT AAGTTTTTAT CAGAAGAAAG TATGAATTAA TCAGATGTTG ATGAGGAGGC 1680
CCTTTTATGT ATTACAACAG GTTGTTCGAT GTGCATGAAT CGACATGAA GCCTGCACAG 1740
CTTGACCGGG AACATATTCC ACTGCAAGAA AGCCTCACCT CTTTGGGTAA CCGCTATATG 1800
GGTATGCGCG GCAATTTTGA AGAGACTTAT TCCGGTGACC ATCAACCAAG AACCTATATT 1860
GCAGGGATAT GGTATCCCGA TAAACCAGG GTTGGCTGCT GGAATAATCCG TTATCCGGAC 1920
TACTTTGGCA AAGTCATCAA CGCTATCAAC CTGTGTTGGT TACGTATATG GATTGATCAG 1980
GAAGAAATTG ATCTATTTAT TGATCACCTT GAACAATTC AACTAGAACT TGATATGAAA 2040
AAAGCAGTTT TCGGTCACTC CTACATTGTC AAACAGCCCG GAAAAATGCT CAAAATTGAA 2100
ATATATCGTT ACGGCAGCAT TGTTCATAAA CAAATTGCGG CTATCCGGTT CCGTGCAACG 2160
AATCTTGAA AACCGGCTAC CATCAAGTTG ATGCCGTATT TGGATGAAA TGTAAAAAT 2220
GAAGACGCGA ATTATGATGA GATGTTTGG ACCGACATCC ATTCCGAAGT GAACGAAAAG 2280

CGGGCAGCTG TTATTACGGA AACGATTGAA AACCCGTTCC GTGTTCCCCG TTTTACTGTT 2340
GCAGCTACGA TGGGATGCAG AACGGATGCA ATTTTGACTA CCCATCAAGC AAAGCCGITA 2400
TATGCTGAAC AAATTTATGA AAAAGAGTTA GGGGAAAACG AATCTCTTCA CTTAGAAAAA 2460
ATTATTGCTG TTACAACAAG TAGAGACTAT GAAAAAGAGC TATTGTTATC CCGTGCGTAT 2520
GAATTACTCG ACCAAGCATT AGAAAGCGGG FATGAAGAAT TATTCCAAGA ACACGCGGCA 2580
GCATGGCAAA AACGATGGGA TAAAGCTGAT BTCCGTATTG TTGGAGATCC GGAAGCACAG 2640
CAAGGCATCC GCTTCAATTT ATTCCAACCT TTTTCCACCT ATTATGGAGA TGATCCAAGA 2700
TTAAACATTG GTCCAAAAGG TTTTACCGGT GAAAAATACG GAGGTGCCAC TTATTGGGAT 2760
ACGGAAGCGT ATGCTGTGCC GATGTATCTT TCTGTCCGAT CTCCGGAAGT AACGAGGAAC 2820
TTGCTGCTTT ACEGTTACAA TCATCTTCCG CAAGCTTACG AAAATGCGAA AAAACTCGGG 2880
CTCAAAGGTG CTCTATATCC AATGGTCACA TTCACAGGGA TTGAATGTCA CAATGAATGG 2940
GAAATAACTT TTGAAGAAAT CCACCGAAAT GCGCAATTG CGTATGCGAT TTATAATTAT 3000
GTTAATTATA CCGGGGATAA GGAGTATATT AACCAATATG GAATTGATGT CCTAGTTGGG 3060
ATCAGCCGCT TTTTGGCGA CCGAGTTCAT TTCTCGCAAC GAAAGCAAAA ATACATGATT 3120
CATGCTGTAA CTGGACCGAA TGAATATGAA AACAATGTTA ACAACAACCTG GTATACAAAC 3180
CGGATTGCTG TCTGGACGCT TAAATTTAGA ATCGCATCAC TCGATAAAAT TGGAAAAGAT 3240
AAAAAAACGG CGCTTAATAT TACGGAAAAA GAACTGACCC AATGGCGTGA TATTATCGAC 3300
CGGATGTACT TTCCGTATGA TGAAAACTC GGTATTTTTC TACAACAGGA TGCTTTTTTA 3360
GACAAGCCGA TTCAACCGGT CAGTGCCATA CCGAGAGAAG ATCTACCACT CAACCAGCAT 3420
TGGTCTTGGG ACCGTATTTT GCGTTCTTGC TATATTAAGC AGGCCGATGT ACTACAAGGA 3480
TTTTATTTCT TTAATGATGA GTTTACAATG GAAGAGAAGC AGCGGCATTT TGAATTTTAC 3540
GAACCGTTAA CCGTCCATGA ATCGAGTCTT TCCCTTTGTG TCCATGCTAT TTTAGCTGCT 3600
GAACTCAGGA AAGAGGACAA AGCGGTGGAG CTGTATAAAC GGACATCTCG CCTCGATTTG 3660
GATAACTATA ACCATGATAC AGAAGACGGG CTGCATATTA CGTCGATGAC CGGAAGTTGG 3720
CTCGCAATCG TCCATGCTTT TGCTGGGATG CGTACGTTCA ATGAAACATT GTCTTTTGCC 3780
CCGTTTTTAC CAAAAATTG GGATGCGTAT GCATTTAAAA TTAATTACCG GAATCGTCTC 3840
CTAGAAGTAA AAGTAAACAA AAAGCACGTA ACGGTTTCCT TGCTTGAAGG GGAACCGCTC 3900
GAATTAACAC TATTTGGGGA GCCTATCTAT TTAACAAATA CCTATACGAA GGAGTATGTG 3960
TGATCTTGAT AGAATCGTGG AAAAAAGCAG TTGTCTATCA AATTTATCCT CGCAGTTTCT 4020

ATGATACAAA CGCGACGGA ATTGGTGATT TGCAAGGAAT TATTGAAAAG CTGGATTATT 4080
TAAAAGAACT TGGCATTGAC TGTATTGGA TTAGTCCTGT GTACGACTCC CCACAGGATG 4140
ACAATGGTTA TGACATCCGC GACTACCGCA AGATTGATAA AATGTTTGGG ACAAACGAAG 4200
ACATGGACCG GCTGCTTGCT GAGGCCACG CACGGGGTAT TAAAGTAGTC ATGGACCTCG 4260
TCGTAAACCA TACATCTGAT GAACATTTCT GGTITGGTGG AAAGCAGGAA GTCAAAAGAT 4320
AATCCGTATC GCGATTTTTA TTTCTGGAAG GATCCAAAGC CGGATGGTTC CCCGCCAAAT 4380
AACTGGGGAT CGATGTTTTT CCGTTCCGCA TGGGAATATG ATGAAAAAAC CCGGCAATAC 4440
TATTTGCATT ATTTTAGCAA GAAACAGCCT GATTTAAATT GGGAAAATGA AAAAGTTCGG 4500
AAAGAAGTAT ATGATTTGAT GAAATACTGG ATGGACAAAG GGGTCGATGG CTGGCGAATG 4560
GATGTTATCG GTTCTATTTC GAAATTTCTC GATTTTCCCG ATTATGAACT TCCTAAGGGC 4620
CAAAAATACG GTGTTGGCAA ATACCATGCA AACGGTCCCTC GTCTCCATGA GTTTATCCAA 4680
GAGATGAACC GTGAAGTGCT GTCAAAGTAT GATTGTATGA CTGTCGGTGA AGCAATCGGA 4740
TCCGATGTTG AAATCGCCAA AATGTACACA GGTGCCGACC GCCATGAACT GAACATGATT 4800
TTCAACTTTG AACATATGGA TGTGATACA ATGCCGGGCA GTTCGGCGGG GAAATGGGCA 4860
TTGAAACCGT TCGATCTGAT TGAATTAAAG CAAATACTCT CCCGCTGGCA GTATGCACTT 4920
TCGGATACAG GATGGAATGC GTTATATTTT GAAAACCACG ATCAGGCACG TGTCGTGTG 4980
CGTTGGGGAA ATGATACAAA CTACCGCATT GAGTGTGCCA AAGCGTTTGC AACGATTTTA 5040
CACGGGTAA AAGGAACGCC TTTTATTTAT CAAGGGGAAG AAATCGGAAT GGTGAACGCT 5100
AAGTTAAAGT TAGCAGAATA TGACGATATT GAAATACGAA ATGCCTACAG AGAACTTGTT 5160
GTGCAAAATC ATATTATGTC GGAGGACGAA TTTTAAACAG CCGTCAGGAA AAAGGGACGC 5220
GATAATGCAC GGACGCCGAT GCAGTGGGAC GACACTCCGC ATGCCGGCTT TACAACCTGA 5280
ACGCCATGGT TGAAGGTGAA TCCCCGTTAT CCGGAAATTA ACGTTACCAA AGCACTTGCT 5340
GATGATCCGA ACTCGATTTT TTATTACTAT CAATCGTTAA TTAAGTTGCG CCATACATAT 5400
AATGTGTTG TGGATGGACG GTATGGAATT GTTGTTACCA AATCATCCCT ACTTATACGT 5460
GTATACGCGA GAAAATGAGT CGGAGAAATT GCTCATCGCC GCCAATATCA GCGAGCATAC 5520
GGTAAGTTTT GAAAAACCTG AGGGAAATG CCGCTTCTTG CITGGAACT ATGATGATAC 5580
GGAAAACAGT ACATTATTCC GCCCATACGA AGCTGCAATT TATTATATGG AGAAATGAAC 5640
CGAGCGGTTG TTCTGAAAT CATCACGGA TGAGGAAAGA GTGCAGGAGC TTCTCCCCAA 5700
GCCAGGAATT CTTCAATGTC ACATGTTGTT CCGATTTAT GAAGGGGACA GTGCGAGGCC 5760
GCTGAGGAAG TCGGAAATAA TTCTGCTAAA CATCGTATTT AGATGTATTT CTGTGTTTTA 5820
TCATACTAAA TATTGTATTA GTAAATCTAT TCAAATAGTT TCGGTGGCCT CGAACAGTAG 5880
GGGTGACATC AATTTGTGAA ACGTTTAATA AGTGGGCTGT TCTTGAAATG ATGACAGGAA 5940
CAGCCCCCTCT TACACTTTCT ACGATCGGTT TCGGTTTAAT TAAATTA 5987

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の耐熱性マルトースホスホリラーゼの最適温度

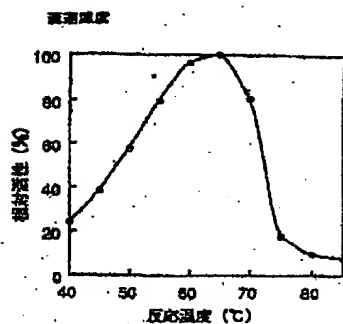
【図2】本発明の耐熱性マルトースホスホリラーゼの熱安定性

【図3】本発明の耐熱性マルトースホスホリラーゼの最適pH

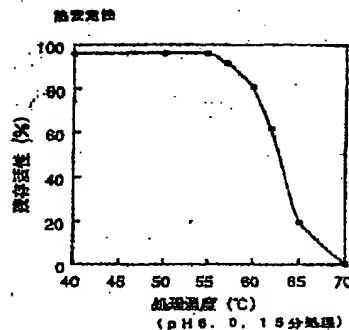
【図4】本発明の耐熱性マルトースホスホリラーゼのpH安定性

【図5】本発明のアラスミドベクターpRMP1の構造

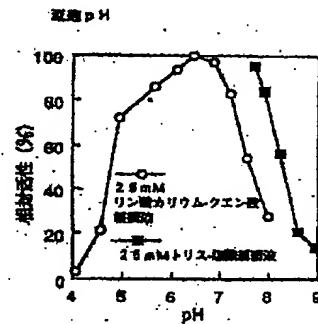
【図1】



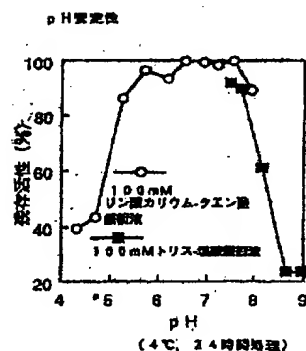
【図2】



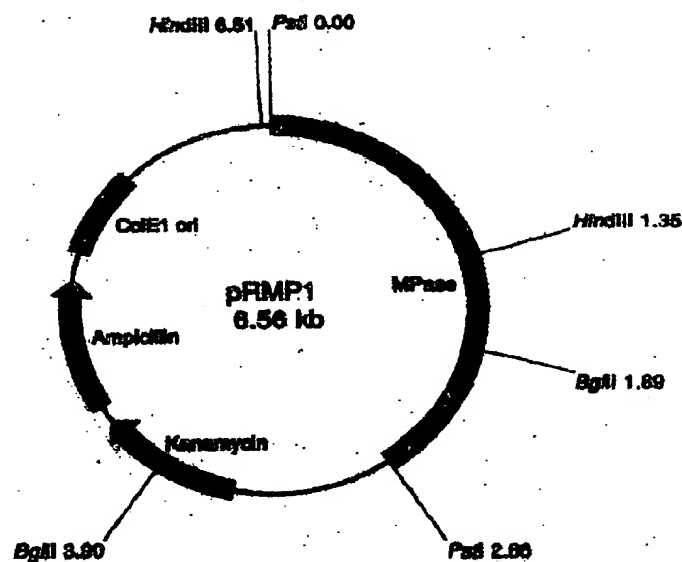
【図3】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁶

C12P 19/12

/(C12N 15/09

C12R 1:07)

(C12N 1/21

C12R 1:19)

識別記号

ZNA

FI

C12P 19/12

(72)発明者 大島 良恵
千葉県船橋市日出2-20-2 昭和産業
株式会社総合研究所内

(72)発明者 山根 國男
茨城県土浦市常名4016-44